EFFEKTE VON KALZIUM UND ANDEREN DIVALENTEN KATIONEN AUF DIE KONDUKTIVITÄT ELEKTRISCH ERREGBARER MEMBRANEN

Dissertation
der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Gerhard Hofmeier

1979

1981

EFFEKTE VON KALZIUM UND ANDEREN DIVALENTEN KATIONEN AUF DIE KONDUKTIVITÄT ELEKTRISCH ERREGBARER MEMBRANEN.

Dissertation der Fakultät für Physik der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Gerhard Hofmeier
aus Berlin

München, den 8.11.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Gutachter: Prof. R. Röhler

2. Gutachter: Prof. P. Wellmann

Tag der mündlichen Prüfung: 1o.2.1981

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung

2. Grundlagen und Zielsetzung

3. Methoden
3.1. Präparat
3.2. Obliche Techniken
3.3. Intrazellulärer Voltage-Clamp
3.4. Somastrom-Messung
3.5. Bestimmung des Membran-Serienwiderstandes
3.6. Temperaturmessung und -Regelung
3.7. Druckinjektion
3.8. Registrierung, Bestimmung von Zeitkonstanten

4. Ergebnisse
4.1. Einfache Depolarisationen
4.2. Zweifache Depolarisationen
4.3. Momentane Messung differentieller Konduktivitäten
4.4. Injektion komplexierender Substanzen
4.5. Variation der divalenten Kationen in der Badlösung
4.6. Injektion divalenter Kationen
4.7. Injektion von TEA-Chlorid
4.8. Messungen bei veränderter Temperatur

5. Diskussion
5.1. Eigenschaften der drei Zelltypen
5.2. Aktivierung des Ca-kontrollierten Systems
5.3. Mathematische Formulierung und Simulation eines kinetischen Modells

6. Literaturverzeichnis

1. Zusammenfassung

Neben der schon länger bekannten membranstabilisierenden Wirkung von Kalzium-Ionen, die auf der Bindung an negative Festladungen an der Außenseite der Membranen beruhen, wurden auch spezifische Effekte auf die elektrischen Eigenschaften von Nervensomamembranen als Folge von intrazellulär erhöhter Kalzium-Aktivität beobachtet. Diese kann physiologisch beim Einstrom von Kalzium-Ionen während Depolarisationen der Membran bewirkt werden. In der vorliegenden Arbeit werden diese Effekte von Kalzium im Vergleich zu anderen divalenten Kationen besonders im Zusammenhang mit der Leitfähigkeit der erregbaren Membranen für Kalium-Ionen betrachtet.

Als Präparat werden Membranen von Neuron-Somata in den Parietalganglien der Weinbergschnecke verwendet, die aufgrund von Geometrie und Größe für solche Messungen ganz besonders geeignet sind. Darüberhinaus bieten sie sich auch als Modelle für komplexere Eigenschaften der neuronalen Elemente des Nervensystems an, da ihre elektrischen Parameter in einem wesentlich weiteren Bereich zu beeinflussen sind, als dies für solche Membranen der Fall ist, die der reinen Impulsfortleitung dienen, wie denen der Axone oder des Ranvier'schen Schnürrings.

Zunächst werden Weiterentwicklungen der Meßmethoden beschrieben, die sich vor allem auf die Kontrolle des Membranpotentials, die zugehörige Strommessung, die Konstanthaltung der Temperatur des Präparates sowie die Injektion von Elektrolyten in die Somazellen beziehen. Auch bei längeren Depolarisationen wird eine weitgehende Unterdrückung möglicher Artefakte durch Elektrodenpolarisation resp. den Axonfortsatz der Zelle erzielt. Die quantitativ kontrollierbare Injektion von Lösungen in Mengen um 10^{-11}l ist bei gleichzeitiger Oberwachung der intrazellulären Plazierung der Injektionspipette möglich.

Aufgrund des Zeitverlaufs der Membranströme bei Depolarisationen in einem über das übliche hinausgehenden Potentialbereich werden die Zellen der durchaus inhomogenen Neuronpopulation im Ganglion der Schnecke in drei Typen P, M und C eingeteilt. Diese Unterscheidung erweist sich im weiteren Verlauf der Untersuchung als relevant bezüglich der Reaktion der Membranströme auf Veränderung der Aktivität divalenter Kationen. Die Charakteristika der Strom-Spannungs-Kurven und Zeitverläufe der Membranströme bei solchen Veränderungen werden beschrieben.

Der Schwerpunkt der Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung einer nur nach dem Einstrom von Kalzium-Ionen durch die Membran aktivierbaren Komponente des Auswärtsstromes, die im Bereich höherer Depolarisationen eine ausgeprägt nichtlineare Kennlinie aufweist. Ein sich in einer ähnlichen Kennlinie manifestierender Effekt mit jedoch gänzlich anderer Genese kann durch die Injektion von Tetraäthylammonium-Chlorid bei gleichzeitiger Blockierung der die physiologischen Ionengradienten aufrechterhaltenden Transportprozesse unter Einsatz von Stoffwechselenergie durch Kühlung des Präparats separiert werden.

Die gewonnenen Daten des Kalzium-abhängigen Systems erlauben die mathematische Formulierung eines kinetischen Modells des Kanals. Es beschreibt diesen in drei Zuständen, die in einem linearen Reaktionsschema über vier Ratenkonstanten verbunden sind. Von diesen sind zwei als konstant angenommen, eine ist proportional dem momentanen Einstrom von Kalzium-Ionen durch den Kanal und nur die letzte ist explizit vom Membranpotential abhängig. Der Test des Modells durch Simulation an einem Analogrechner zeigt im ganzen untersuchten Potentialbereich befriedigende Übereinstimmung mit den experimentellen Membranströmen.

2. Grundlagen und Zielsetzung

Membranen dienen bei allen tierischen und pflanzlichen Zellen als eindeutige, klar definierte Begrenzung dieser organischen Grundbausteine. Lebende Zellen sind offene Systeme, die ständig im Energie- und Stoffaustausch mit ihrer Umgebung stehen. Somit besteht die Aufgabe der Membran sowohl in der Abdichtung des intrazellulären Raums von der Umgebung, als auch im selektiven Transport von bestimmten Molekülen und Ionen in beiden Richtungen. Durch aktiven Transport unter Aufwendung von Stoffwechselenergie werden zwischen Innen- und Außenraum Konzentrationsgradienten geschaffen, die nicht dem thermodynamischen Gleichgewicht entsprechen. Im allgemeinen besteht auch ein elektrischer Potentialgradient durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen bei gleichzeitiger Ionenselektivität der Membran.

Nach heutiger Vorstellung ist den organischen Membranen der prinzipielle Aufbau aus einer Lipid-Doppelschicht mit darin eingelagerten Protein-Molekülen gemeinsam, wobei ihre Dicke generell etwa 7.5 nm beträgt (Singer und Nicolson 1972). Die jeweils unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener Membranen ergeben sich aus den relativen Anteilen spezifischer Moleküle. Eine besondere Rolle kommt dabei den Proteinen zu. Neben solchen, die sich nur einseitig in oder an einer Seite der Membran befinden, gibt es auch solche, die sich durch die Membran erstrecken, wobei die hydrophoben, ungeladenen Teile im Inneren der Membran sind, während die hydrophilen Teile sich den wässrigen Außenmedien zuwenden. Die spezialisierten aktiven und passiven Transportvorgänge über die Membran, die zur Aufrechterhaltung des inneren Milieus der Zelle notwendig sind, werden durch diese Proteine vermittelt. Neben den Ausgangs- und Endprodukten des Zell-Metabolismus werden auch Ionen transportiert, teils aktiv entgegen dem jeweiligen Gradienten des elektro-chemischen Potentials, teils passiv unter dessen Ausnutzung. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich ausschließlich auf diesen passiven Teil des Ionentransports, der seine Energie aus unter den gegebenen Bedingungen als konstant angenommenen Batterien bezieht.

Im Spezialfall der Nervenzellen haben diese die Fähigkeit entwickelt, das aus ihnen resultierende Membranpotential gezielt zu verändern und so elektrische Signale zur Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung von Informationen zu erzeugen. Der Informationsgehalt der Signale kann bei Fortleitung über kurze Strecken analog vorliegen (graduierte Potentiale, Rezeptoren), bei allen längeren Obertragungen

ist er jedoch durch Einheitsimpulse kodiert. Entsprechend der Entstehung des Membranpotentials aus den Diffusionspotentialen der verschiedenen intra- und extrazellulären Ionen (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-) sowie eventuell elektrogenen aktiven Transportvorgängen werden diese Änderungen durch Beeinflussung der selektiven Permeabilitäten der Membran für bestimmte Ionen bewirkt. In den Rezeptoren kann die Permeabilitätssteuerung unmittelbar durch die Umweltreize erfolgen, während im Falle der elektrisch erregbaren Membran das Membranpotential selbst zur Steuerung der Permeabilitäten dient. Im allgemeinen Fall werden sie durch chemische Einflüsse gesteuert, wobei eine Vielzahl von Substanzen in Frage kommt, von einfachen Ionen bis zu den hochmolekularen Verbindungen der Transmitter oder den Hormonen.

Ionen können somit eine Doppelrolle spielen als eigentliche Ladungsträger sowie auch als Modulatoren der Membranpermeabilitäten. Eine solche Modulation ist vor allem an den Elementen des Nervensystems von Bedeutung, die nicht wie etwa die Axone im wesentlichen nur der Impulsfortleitung nach dem "Alles-oder-Nichts"-Prinzip dienen, sondern mittels denen die Impulse miteinander verknüpft und weiterverarbeitet werden. Dies geschieht u.A. an den Membranen der Neuron-Somata.

Elektrischen Messungen zugänglich sind die Potentiale der Kompartimente zu beiden Seiten der Membran sowie der Summenstrom aller beteiligten Ionen. Während die ionale Zusammensetzung der extrazellulären Badlösung bekannt und in weiten Grenzen manipulierbar sein kann, gilt dies für das Zellplasma auf der Innenseite nur bei wenigen biologischen Präparaten (Adelman 1971, Kostyuk und Krishtal 1977) oder bei künstlichen Membranen.

Der elektrische Widerstand künstlicher reiner Lipid-Membranen liegt mit etwa $10^9\ \Omega{\cdot}cm^2$ (Howard und Burton 1968, Goldup et al. 1970) um mehrere Größenordnungen höher als der von elektrisch erregbaren natürlichen Membranen. Er wird dagegen mit dem natürlicher Membranen vergleichbar, wenn man z.B. eine geeignete, aus natürlichem Material gewonnene Proteinfraktion hinzufügt (Mueller et al. 1962), was die Bedeutung der Membranproteine für den Ladungstransport unterstreicht. Die mit ca. 1 $\mu F/cm^2$ sehr hohe spezifische Kapazität der Membranen scheint im wesentlichen eine Eigenschaft der Lipid-Matrix selbst zu sein (Benz et al. 1975). Unter der Annahme einer relativen Dielektrizitätskonstante von 3, die für Öle gilt und daher für den hydrophoben Kern der Bilipid-Schicht angewendet wird, ergibt sich für diesen eine Dicke von etwa 3 nm (White 1977). Eine ganze Anzahl von Modellen der elektrischen Erregbarkeit der Nervenmembranen wurde entwickelt,

die auf den passiven Eigenschaften solcher Lipidschichten unter Berücksichtigung der Elektrodiffusion beruhten (Teorell 1948, Wei 1968, Hägglund 1972), doch war keines davon in der Lage, die Meßergebnisse befriedigend zu erklären.

In Übereinstimmung mit den erwähnten Befunden über die durch Proteine um Größenordnungen vermehrte Konduktivität der Bilipid-Membranen wird daher heute angenommen, daß der Ionentransport an speziellen "Poren" oder "Kanälen" stattfindet (Hille 1970). Diese bestehen aus Makromolekülen, die unter äußeren Einflüssen Konformationsänderungen ausführen können. Auch ohne Kenntnis der molekularen Struktur dieser Makromoleküle lassen sich kinetische Modelle angeben, die die Übergänge zwischen den verschiedenen Konformationen beschreiben (Hodgkin und Huxley 1952, Hille 1975). Für verschiedene Polypeptide, die in geeigneten künstlichen Bilipid-Schichten den selektiven Transport bestimmter Ionen vermitteln können, sind molekularer Aufbau und Wirkungsweise bereits gut bekannt (Urry et al. 1975), für Kanäle natürlicher Membranen jedoch erst im Ansatz (Smythies et al. 1974).

Da bei den elektrisch erregbaren Membranen in erster Linie das Potential die Ionenpermeabilitäten steuert, sollte für ihre Untersuchung dieser Parameter möglichst unabhängig kontrollierbar sein. Es bereitet allerdings technische Schwierigkeiten, den dazu notwendigen niederohmigen Zugriff zu beiden Seiten der Membran zu schaffen. Aufgrund der geometrischen Verhältnisse ist die Innenseite lebender Membranen nur mit Mikroelektroden zu erreichen, deren Widerstand mindestens in der gleichen Größenordnung wie der Membranwiderstand selbst liegt, so daß stets eine beträchtliche Spannungsteilung auftritt. Dazu kommt noch das bei allen Messungen an Ionenleitern auftretende Problem der Elektrodenpolarisation durch den bei der Messung fließenden Strom. In der Technik des "voltage-clamp" werden daher Potentialmessung und Stromzuführung getrennt von zwei Elektroden übernommen und durch deren Verschaltung in einer rückgekoppelten Schleife der niederohmige Zugriff zur Innenseite der Membran künstlich geschaffen (Marmont 1949, Cole 1949, Hodgkin und Huxley 1952, Dodge und Frankenhaeuser 1958). Bei Verwendung rechteckförmiger Spannungssprünge wird dann gleichzeitig der zur Umladung der Membrankapazität nötige Strom in einer schnellen Spitze, dem sog. kapazitiven Artefakt, zusammengefaßt. Er ist damit separiert von dem sich langsamer ändernden eigentlichen Membranstrom, der der Ausdruck der Relaxation der Membranpermeabilitäten auf die beim neuen Potential gültigen Gleichgewichtswerte ist.

Um eindeutige Ergebnisse zu erhalten, muß offensichtlich die ganze Fläche der untersuchten Membran stets isopotential sein. Diese Bedeutung ist für kugelsymmetrische Zellen auf einfache Weise zu erfüllen (Eisenberg und Engel 1970). Die nahezu kugelförmigen Somazellen von Schnecken, deren Membrangeometrie nicht durch Dendriten oder Synapsen gestört ist (Kunze 1919) sind methodisch also gut geeignet. Nachteilig ist allein das Axon, das eine Kabelstruktur darstellt und daher über seinen Längswiderstand nur langsam aufgeladen wird. Die kapazitiven Stromartefakte werden dadurch so verschliffen, daß Messungen der aktivierten Ströme erst etwa 2 ms nach einem Potentialsprung möglich sind (Neher 1971).

Eine zusätzliche Komplikation stellen die im Axon entstehenden Aktionspotentiale dar, die mit einer von der Höhe der Depolarisation abhängigen Latenz auftreten und deren Ströme eine Untersuchung der Somamembranströme gerade im Bereich der Aktivierungsschwelle unmöglich machen (Frank und Tauc 1964, Neher und Lux 1969). Als Abhilfe werden verschiedene Methoden der mechanischen und enzymatischen Ausschaltung des Axons verwendet (Alving 1969, Connor und Stevens 1971, Connor 1977, Kostenko et al. 1974, Kostyuk et al. 1974). Es ist jedoch nicht immer gewährleistet, daß dabei das Soma unbeschädigt und in seinen Eigenschaften unverändert erhalten bleibt (Neild 1974). Neher und Lux (1969) entwickelten daher die Methode der lokalen Strommessung mittels einer auf das Soma aufgesetzten Halbmikropipette, die in modifizierter Form auch für die vorliegende Untersuchung verwendet wurde.

Die Fragestellung geht von der schon länger bekannten Tatsache aus, daß die intrazelluläre Konzentration des Kalzium-Ions, welches als wichtigstes divalentes Kation in den extrazellulären Medien in Konzentrationen von mehreren mM/l vorkommt, sich unter physiologischen Bedingungen in einem extremen Nicht-Gleichgewicht befindet. Erste Abschätzungen der intrazellulären Kalzium-Aktivität ergaben Werte von weniger als 10^{-5} M (Hodgkin und Keynes 1956) oder 10^{-6} M (Portzehl et al. 1964), die etwa um den Faktor 10^5 unter dem liegen, wie sie bei rein passiver Verteilung zu erwarten wären. Neuere Messungen mit Ca-selektiven Ionen-Austauscher-Elektroden an Schnecken-Neuronen ergaben sogar Werte um 5×10^{-7} M (Owen et al. 1977, Christoffersen und Simonsen 1977).

Diese geringen Konzentrationen bedeuten, daß schon geringste Mengen zusätzlicher Ca-Ionen ein starkes Ansteigen der intrazellulären Ca-Aktivität bewirken und die Gleichgewichte Ca-abhängiger Reaktionen drastisch verschieben können. Durch Einstrom von Kalzium ausgelöste Funktionen sind beispielsweise die Muskelkontraktion

(Reuter 1973) sowie die Sekretion von Zellmaterial in den Extrazellulärraum (Douglas 1974), mit dem wichtigen Spezialfall der Ca-induzierten Transmitterausschüttung bei der synaptischen Übertragung (Katz und Miledi 1967).

Als elektrisch direkt nachweisbarer Effekt einer erhöhten intrazellulären Ca-Aktivität wurde bei elektrisch erregbaren Somamembranen eine erhöhte Leitfähigkeit für Kalium-Ionen gefunden (Meech 1972, Krnjevic und Lisiewicz 1972), während sich an der Axonmembran des Tintenfischs praktisch keine Wirkung ergab (Begenisich und Lynch 1974). Da bei Erregung der Membran Ca-Ionen längs ihrem Konzentrationsgradienten in die Zelle einströmen und dort eine meßbare Konzentrationserhöhung bewirken (Baker et al. 1971, Stinnakre und Tauc 1973, Lux und Heyer 1977), stellte sich die Frage, ob auch der bei Depolarisation zeitabhängig aktivierbare Kalium-Auswärtsstrom (Neher und Lux 1971) durch diese Ca-Ionen beeinflußt wird.

Dieser Auswärtsstrom der Nervensomamembranen von Helix weist Eigenschaften auf, die ihn von den Strömen axonaler Membranen unterscheiden. Der Zeitverlauf seiner Inaktivierung (Neher und Lux 1969) ist prinzipiell nicht durch eines der kinetischen Modelle mit Reaktionen 1. Ordnung zu beschreiben, wie sie für andere Präparate entwickelt wurden (Hodgkin und Huxley 1952, Frankenhaeuser 1963). Zudem ergab die Untersuchung des Einflusses von Tetraäthylammonium (TEA) auf den Auswärtsstrom, daß bei den Somamembranen auch mit hohen Dosierungen stets nur ein Teil des Auswärtsstroms blockierbar ist (Neher und Lux 1972), während bei Axonmembranen die Wirkung wesentlich deutlicher ist (Armstrong und Binstock 1965, Armstrong und Hille 1972).

Die Neurone des supraoesophagealen Komplexes der Schnecke stellen nun keineswegs eine einheitliche Population dar. Dies geht sowohl aus histologischen (Kunze 1919, Fernandez 1966) wie elektrophysiologischen Untersuchungen hervor (Sakharov und Salanki 1969, Walker et al. 1970, Kerkut et al. 1975). Um unter solchen Bedingungen dennoch zu eindeutigen Ergebnissen zu gelangen, bieten sich prinzipiell zwei Wege an. Man kann sich entweder auf eine topographisch oder besser noch elektrophysiologisch eindeutig bestimmbare Zelle beschränken, wozu die sog. "Burster"-Zelle im rechten Parietalganglion von Helix besonders geeignet ist (Sakharov und Salanki 1969, Salanki und Vadasz 1973, Heyer und Lux 1976a), oder man versucht, aus der Vielzahl der möglichen Merkmale aller Zellen solche zu bestimmen, die zur Klassifizierung der für die Untersuchung relevanten Eigenschaften geeignet sind. In der vorliegenden Untersuchung wurde der zweite Weg beschritten, wobei aus tech-

nischen Gründen allerdings eine Beschränkung auf Zellen mit Durchmessern nicht unter 100 µm stattfand. Als geeignetes Kriterium für diesen Zweck erwies sich der Zeitverlauf ihrer Auswärtsströme über einen größeren Potentialbereich.

Für die so charakterisierten Zellen wurde speziell nach Interaktionen von Kalzium mit den im Voltage-Clamp bei Depolarisation meßbaren Membranströmen gesucht. In Anbetracht der noch lückenhaften Kenntnisse über Art und Ausmaß solcher Einflüsse konnte es nicht die primäre Aufgabe sein, allgemein gültige Parameter mit größtmöglicher numerischer Genauigkeit zu bestimmen. Vielmehr sollte zunächst versucht werden, unter Anwendung verschiedener Methoden und im Vergleich mit anderen divalenten Kationen einen Beitrag zur Systematik der Vielzahl von phänomenologischen Beobachtungen zu leisten. Es liegt dabei in der Natur der Meßobjekte, daß bei der Darstellung der Ergebnisse häufig auf "typische" Verläufe hingewiesen wird. Wesentliche Schlußfolgerungen sind vorerst nämlich nur qualitativ faßbar, solange eine volle Aufklärung der Vorgänge auf molekularer Ebene noch nicht möglich ist.

3. Methoden

3.1. Präparat

Neurone von Schnecken sind aus mehreren Gründen für elektrophysiologische Untersuchungen besonders geeignet. Als Zellen wechselwarmer Tiere stellen sie einerseits zum Oberleben keine besonderen Anforderungen an die Umgebungstemperatur, andererseits lassen sich aber auch Temperaturkoeffizienten etwa zur Bestimmung von Aktivierungsenergien ohne weiteres über einen größeren Temperaturbereich messen. Da die Tiere ein offenes Gefäßsystem haben, bei dem die Hämolymphe in kontinuierlicher Verbindung zur interstitiellen Flüssigkeit steht und die Gewebezellen direkt umspült, genügt es, die Ganglien in physiologischer Lösung zu baden, ohne daß besondere Aufwendungen zur Perfusion oder Oxygenierung erforderlich wären.

Die in den Ganglien der Schnecken enthaltenen Neurone sind von höchst unterschiedlicher Größe. Für elektrophysiologische Untersuchungen werden i.A. nur solche mit mehr als etwa 50 µm Durchmesser verwendet, während die sog. Riesenzellen, in die auch Injektionen wässriger Lösungen unter Druck möglich sind, Durchmesser von mehreren 100 µm erreichen können.

Als besonderer Vorteil ist die schon erwähnte annähernde Kugelform anzusehen, die ganz im Gegensatz steht zu den komplizierten Strukturen dendritischer Fortsätze, die für viele Neurone von Wirbeltieren charakteristisch sind. Die Somamembran ist zudem völlig frei von synaptischen Kontakten, obwohl sie durchaus empfindlich ist gegenüber als Neuro-Transmitter bekannten Substanzen (Kerkut und Walker 1961).

Von den als Untersuchungsobjekt in Frage kommenden Arten bietet sich wegen ihrer leichten Verfügbarkeit vor allem die Weinbergschnecke (Helix pomatia) an. Ihre Ganglien sind in einem Schlundring zusammengefaßt, der einen Durchmesser von etwa 4 mm aufweist. Er kann sehr schnell und einfach bei Beobachtung mit bloßem Auge oder leichter Vergrößerung herauspräpariert und in der Meßkammer fixiert werden.

Die nach der Freipräparation der Zellen sichtbare Oberfläche der Zellen besteht noch aus Bindegewebs- und Gliazellen, die die eigentliche Membran in einer Schicht von bis zu 10 µm bedecken (Amoroso et al. 1964, Karpenko 1966, Salanki et al. 1972, Bocharova et al. 1975, Kreutzberg und Lux 1978, unveröffentlicht), die Penetration der Glas-Mikroelektroden aber nicht behindern. Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen wie auch aus Messungen der spezifischen Membrankapazität (Neher 1971) geht hervor, daß die eigentliche Membran durch Einfaltungen eine um etwa den Faktor

3-5 größere Oberfläche hat als eine Kugel gleicher Größe. Weder der Stromfluß noch die freie Diffusion auf beiden Seiten der Membran scheint dadurch jedoch wesentlich beeinträchtigt zu sein (Mirolli und Gorman 1973).

3.2. Übliche Techniken

Alle Untersuchungen wurden an Nervensomazellen der Weinbergschnecke, Helix pomatia, durchgeführt. Zum Überblick folgt hier zunächst eine Schilderung der dazu verwendeten Methoden und Hilfsmittel, die in der Elektrophysiologie allgemein üblich sind. Detailliert werden dann nur die Methoden geschildert, die für die vorliegende Arbeit speziell weiterentwickelt worden sind.

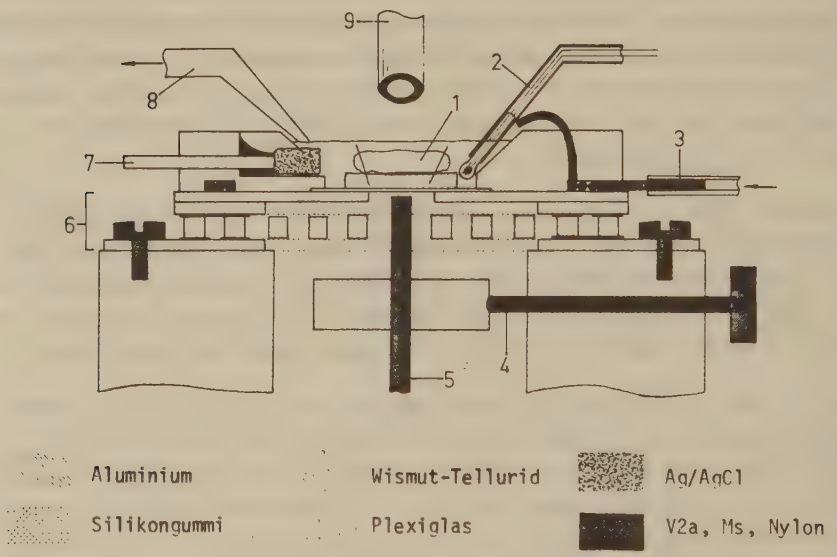


Abb. 3.1 Querschnitt durch die Meßkammer. 1) Präparat; 2) Thermistor; 3) Zuführung frischer Ringerlösung; 4) Justierschraube des Lichtleiters 5) zur Durchlicht-Beleuchtung; 6) Peltier-Element; 7) Ag/AgCl-Elektrode; 8) Absaugung überschüssiger Ringer-Lösung; 9) Lichtleiter zur Auflicht-Beleuchtung.

Abb. 3.1 zeigt den Querschnitt der für die Messungen konstruierten Anordnung. Das Präparat 1) ist mit feinsten Insektennadeln (Minutien) auf einem Kissen aus Silikonkautschuk (Wacker-Chemie, Elastosil E 41) in der Plexiglasmeßkammer befestigt. Die Füllmenge der Kammer beträgt 0.5 ml. Der Boden besteht aus einer nur 0.15 mm starken Glasscheibe (Mikrosköpdeckglas), damit ein optimaler Wärmeübergang zu dem darunter befindlichen Peltier-Element 6) stattfinden kann, dessen obere Deckplatte eine Bohrung von 6 mm Durchmesser für den Lichtdurchtritt aufweist. Die Beleuchtung erfolgt im Durchlicht mit einem flexiblen Lichtleiter 5) von 1.5 mm aktivem Durchmesser, der das Präparat senkrecht von unten durchstrahlt. Man erhält auf diese Weise ein sehr helles und kontrastreiches Bild. Der Lichtleiter ist mit zwei Justierschrauben 4) verstellbar und kann so nach der Montage des Präparates zur optimalen Ausleuchtung bestimmter Zellen ausgerichtet werden. Ein weiterer, schräg von oben leuchtender Lichtleiter 9) mit 3 mm aktivem Durchmesser wird während der Montage des Präparates in der Kammer zur Beleuchtung im Auflicht benutzt. Beide Leiter werden durch eine 50 W Projektionslampe ausgeleuchtet, deren Intensität über einen Regeltrafo einstellbar ist. Die Lampe befindet sich zusammen mit der anderen Elektronik in einem 19" Geräteschrank, abgesetzt vom Meßplatz, wodurch die Gefahr der Brummeinstreuung am Ort des Präparates vermieden wird.
Zur Definition des Badpotentials und zur Ableitung der von der Stromelektrode injizierten Ströme dient eine seitlich fest eingebaute Ag/AgCl-Elektrode 7). Der Strom dieser Elektrode wird mit einem konventionellen Stromspannungswandler gemessen.
Die Zuführung frischer Ringer-Lösung erfolgt über ein seitlich einmündendes Röhrchen 3) aus nichtrostendem Stahl von 1 mm Außendurchmesser, das zur Vortemperierung der Lösungen in drei Windungen mit der Deckplatte des Peltier-Elementes in Kontakt steht. Die Dosierung erfolgt mit einer Injektionsspritze, die über einen feinen PVC-Schlauch mit dem Rohransatz verbunden ist. Oberschüssige Lösung wird ständig von oben abgesaugt.
Zur Beobachtung des Präparates wird ein Stereomikroskop (Wild, M5) mit einer einstellbaren Vergrößerung von 6- bis 50-fach verwendet.
Sämtliche Elektroden zielen von schräg oben in die Präparierkammer. Die Strom- und die Spannungselektrode sind in je einem Rodenstock-Manipulator geführt, während zur Plazierung der Kombination Referenz/Patch-Pipette (s. Kap. 3.4) sowie einer evtl. Injektionselektrode je ein Leitz-Mikromanipulator eingesetzt ist.

Zur Präparation des Ganglions wird zunächst von aktiven, d.h. nicht winterschlafen-

den Schnecken mit einem Skalpell das Gehäuse abgetrennt und bei 6-facher Vergrößerung unter der Stereolupe der Schlundring herauspräpariert. Nach Befestigung des Ganglions in der Meßkammer wird die äußere Bindegewebslage mit einer feinen Pinzette von den darunterliegenden Neuronkomplexen abgehoben und mit einer spitz zugeschliffenen Irisschere bis an den Rand etwa kreisförmig abgeschnitten. Zur notwendigen Entfernung der die einzelnen Teilganglien dann noch umgebenden sogenannten inneren Kapsel werden sehr spitz zugeschliffene Pinzetten und feine Glashäkchen verwendet. Durch die stellenweise sehr feste Verbindung dieser enganliegenden Hülle mit den Zellen können diese dabei leicht beschädigt werden.

Die Arbeit wird wesentlich durch Anwendung des relativ unspezifisch wirkenden proteolytischen Enzyms Pronase erleichtert. Es wird als Pulver mit einer Pinzette auf das Ganglion aufgebracht und anschließend mit Ringer-Lösung überschichtet. Nach etwa 10 bis 20 Sek. Einwirkung wird das in der Lösung befindliche Enzym mit mindestens dem 20-fachen Kammervolumen ausgespült. Der im Bindegewebe verbleibende Rest weicht in den folgenden 30 Minuten (während weiter mehrfach mit frischer Lösung gespült wird) die erwähnten Verbindungen so weit auf, daß sich die Hülle leicht als Ganzes entfernen läßt. Da Pronase ein weites Wirkungsspektrum hat, ist eine schädigende Wirkung, auch auf die Neurone selbst, nicht von vornherein auszuschließen (Rojas und Atwater 1967, Rojas und Armstrong 1971, Armstrong et al. 1973). In Kontrollexperimenten mit unbehandelten Ganglien konnten jedoch alle wesentlichen in dieser Arbeit beschriebenen Effekte in gleicher Weise nachgewiesen werden. Falls diese Methode der Präparation Einfluß auf die relevanten Membraneigenschaften hat, ist dieser so gering, daß er erst bei wesentlich genauerer quantitativer Analyse ins Gewicht fallen würde.

Für Potentialableitung und Strominjektion wurden maschinengezogene Glasmikroelektroden aus Kapillaren von 1.5 mm Außendurchmesser und 0.35 mm Wandstärke hergestellt. Die Füllösung der Ableitelektroden war 3 M KCl, da hiermit die kleinsten Diffusionspotentiale auftreten. Stromelektroden wurden mit einer Mischung aus 1.5 M KCl und 1.5 M KCitrat im Verhältnis 1:9 gefüllt. Citrat scheint der Blockade der Elektroden bei Stromfluß entgegenzuwirken, während Zusatz von Chloridionen eine Auflösung des Ag/AgCl-Systems verhindert. Die Stromelektroden wurden durch einen geerdeten manuell aufgebrachten Überzug aus Leitsilber (Doduco Auromal 37 M) abgeschirmt, der durch anschließendes Lackieren mit Q-Dope (QC-Electronics, Rockford, Illinois) gegen die Badlösung isoliert wurde. Die Elektroden hatten zum Zeitpunkt der Anwen-

dung Spitzendurchmesser zwischen 1 und 3 µm, mit Widerständen von 2 bis 20 MegOhm. Als Obergang von der Ionenleitung in der Elektodenfüllösung zur Elektronenleitung der Verstärker Ein- und Ausgänge diente das nicht polarisierbare System Ag/AgCl.

Elektrolytisch in 0.1-normaler HCl mit einer AgCl-Schicht überzogene reine Silberdrähte sind zwar elektrisch hinreichend stabil, mechanisch jedoch sehr empfindlich gegen Abstreifen der Schicht beim Einstecken der Drähte in die Glaskapillaren. Mechanisch stabilere Elektroden erhält man durch Eintauchen von zwei miteinander verdrillten Silberdrähten mit einem Durchmesser von je 0.25 mm in eine Schmelze von AgCl (Petersen 1968). Je zwei solcher überzogenen Elemente wurden in einem Becherglas in 0.1-normaler HCl mit 1 mA Gleichstrom und Umpolen der Stromrichtung alle 100 Sek. über Nacht formiert. Nach gründlichem Spülen konnten die so hergestellten Systeme bei völliger elektrischer und mechanischer Stabilität monatelang verwendet werden.

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$MgCl_2$	Tris	Sr-, Ba-, Co-, $NiCl_2$
				mM		
Normalringer (NR)	60	4	10	10	5	0
Ca-Reihe	45	4	0.3	29.7	5	0
	45	4	3	27	5	0
	45	4	30	0	5	0
Sr-, Ba-, Co-, Ni-Ringer	60	4	0	0	5	20

Alle Lösungen enthielten 5 mM/l Glukose.
Tabelle 3.1 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.

Neuere Arbeiten zeigen, daß die ionale Zusammensetzung der Hämolymphe im lebenden Tier in weiten Grenzen schwankt und außerdem jahreszeitlichen Änderungen unterworfen ist (Meincke 1974, 1975a,b). Ähnliche Unterschiede wurden von verschiedenen Autoren auch bei bisher verwendeten Ringer-Lösungen gefunden (Kerkut und Thomas 1964, Meves 1968, Chamberlain und Kerkut 1969, Gola und Romey 1971, Gainer 1972, Stepita-Klauco et al. 1973, Meech 1974). In Anlehnung an die Arbeiten von Meincke wurden die in Tabelle 3.1 zusammengestellten Rezepte angewandt. Um maximale Wirkung zu erzielen, sind beim Testen der divalenten Kationen Sr, Ba, Co, Mn i.A. sowohl Kalzium als auch Magnesium gegen 20 mM/l des jeweils zu untersuchenden Kations

ausgetauscht worden. Lanthan ist dagegen additiv zu Normalringer zugegeben worden. Alle Lösungen wurden mit Tris-HCl-Puffer auf einen p_H-Wert von 7.8 eingestellt. Die Konzentration der Injektionslösungen betrug 0.2 M/l; sie wurden teilweise mit Histidinhydrochlorid (Meech 1972) auf p_H 7.4 abgepuffert. Später sind gleiche Resultate mit ungepufferter reiner Lösung erzielt worden.

3.3. Intrazellulärer Voltage Clamp

Zur potentiostatischen Regelung des Membranpotentials wurde die schon vielfach verwendete Zwei-Elektroden-Anordnung übernommen und in Einzelheiten modifiziert. Bei dieser Methode erfolgt die Messung des Istwertes des Membranpotentials stromlos durch eine Mikroelektrode, während die Stellgröße - der Membranstrom - über eine andere Elektrode zugeführt wird. Die Qualität eines derartigen Potentiostaten kann primär nach drei Kriterien beurteilt werden: 1. Isopotentialität über die gesamte Membran (Hellerstein 1968); 2. Ansprechgeschwindigkeit bei rechteckförmiger Auslenkung des Membranpotentials und 3. Genauigkeit der Einhaltung des vorgegebenen Soll-Wertes.

Zu 1. Es ist nicht a priori selbstverständlich, daß sich bei Stromfluß ein einheitliches Potential über die gesamte Membran der Zelle ausbildet. Für Zellen mit sphärischer Geometrie konnte jedoch gezeigt werden, daß bei Anordnung der beiden Elektroden in einem Raumwinkel von 60^o die räumliche Variation des Potentials minimal ist (Eisenberg und Engel 1970, Peskoff und Eisenberg 1975, Peskoff und und Ramirez 1975). Da die Neuronen von Helix pomatia annähernd Kugelform haben, wurden die beiden Elektroden unter diesem Winkel angeordnet. Bei allen Experimenten, in denen mit der Injektionselektrode (s. 3.6) eine zweite unabhängige Potentialmessung an einer von der Meßelektrode weit entfernten Stelle möglich war, sind keine sichtbaren Unterschiede im Potentialverlauf festgestellt worden.

Zu 2. Wie Neher (1970) gezeigt hat, ist die Geschwindigkeit des Potentiostaten in erster Linie vom Frequenzgang der Kombination Potentialelektrode/Vorverstärker abhängig. Durch kapazitive positive Rückkopplung eines Teils der Ausgangsspannung des Vorverstärkers auf dessen Eingang wird die Eingangskapazität neutralisiert (Moore und Gebhardt 1962, Guld 1962) und die Grenzfrequenz zu wesentlich höheren Werten verschoben. Wenn die Grenzfrequenz des niederohmig angesteuerten Verstärkers ω_V ist und ω_E die Grenzfrequenz der RC-Kombination Mikroelektrode/Verstärker-Eingangskapazität, so ist durch diese Maßnahme eine erhöhte Grenzfrequenz von $\sqrt{\omega_V \cdot \omega_E}$ erzielbar.

Bei hohen Depolarisationen großer Somazellen können Ströme von mehreren µA fließen, die an der Badelektrode einen Spannungsabfall von einigen mV ergeben können. Zur Vermeidung dieses Fehlers wird das Potential an der Außenseite der Membran deshalb normalerweise nicht über diese Elektrode abgenommen, sondern stromlos mit einer separaten Elektrode ("Referenzelektrode"). Die Signale der intrazellulären Mikroelektrode und der Referenzelektrode werden direkt in einem Differenzverstärker voneinander subtrahiert und nur die Differenz zehnfach verstärkt. Wird nun das zur Kapazitäts-Neutralisation verwendete Signal am Ausgang des Differenzverstärkers abgenommen, so enthält es das Gleichtaktsignal der Badelektrode mit umgekehrtem Vorzeichen. Dieser Teil des intrazellulären Potentials wird also mit falscher Polarität auf den Eingang der Potentialelektrode gekoppelt. Aufgrund der wesentlich niedrigeren Impedanz der Referenzelektrode (typisch 100 kOhm gegen 4 MOhm der intrazellulären Mikroelektrode) ist dieses falsche Signal zusätzlich noch relativ schnell, so daß die Folge eine erhöhte Schwingneigung der Regelschleife ist.
Eine Verbesserung erreicht man durch Abnahme des Signals der intrazellulären Elektrode direkt hinter dem Eingangsimpedanzwandler des verwendeten Differenzverstärkers (Ancom 1582). Die Grenzfrequenz dieses Ausgangs liegt zusätzlich wesentlich höher als die des Differenzausgangs, so daß ein besserer Oberalles-Frequenzgang zu erwarten ist. Das für die Kapazitätsneutralisation erforderliche verstärkte Signal wird mit einem separaten sehr schnellen Verstärker erzeugt. Diese Maßnahme beseitigt die ursprüngliche Neigung zur Instabilität. Das erzielbare typische Ansprechverhalten des Potentiostaten bei rechteckförmigen Sprüngen im Membranpotential zeigt die Abb. 3.6 in Kap. 3.4.
Zu 3. Die Genauigkeit der Regelung ist im wesentlichen eine Funktion der Schleifenverstärkung. Deren Maximalwert unter Erhaltung der Stabilität der Regelschleife ist durch den Abstand der beiden Zeitkonstanten

$$\tau_M = R_M \cdot C_M \quad \text{und} \quad \tau_A = \sqrt{\frac{1}{\omega_V \cdot \omega_O}}$$

gegeben (Koopman 1968) und liegt typisch bei etwa 60 dB.
Bei Erregung der Membran durch Depolarisation sinkt deren Widerstand jedoch auf etwa 1% des Ruhewertes ab. Durch die Spannungsteilung an R_I-R_M, wobei R_I Werte von einigen MegOhm hat, sinkt die Schleifenverstärkung dabei beträchtlich. Außerdem muß in dieser Lage die Stromelektrode Ströme von mehreren µA liefern, was nur zu häufig zu einer zusätzlichen Erhöhung des Widerstandes dieser Elektrode führt.
Die Folge ist ein Absinken des Membranpotentials im Laufe des Pulses (s. Abb. 3.2.A).

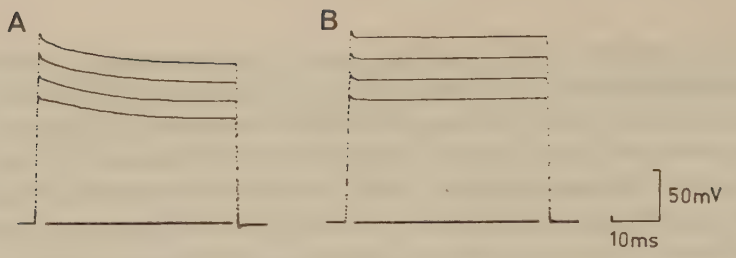


Abb. 3.2 Zur Wirkung der Integralregelung, siehe Text.

Durch Einschalten eines Netzwerkes mit dem in Abb. 3.4.B gezeigten Bode-Diagramm, dessen Zeitkonstante mit dem Potentiometer P auf τ_M eingestellt wird, erreicht man einen Gesamt-Frequenzgang, der bei ruhender Membran noch stabil ist, sich aber auch bei erregter Membran noch durch hohe Regelverstärkung auszeichnet. Den praktischen Effekt einer solchen Integralregelung zeigt Abb. 3.2.B. Die gezeigten Stromspuren wurden jeweils abwechselnd mit denen von 3.2.A aufgenommen, jedoch mit eingeschalteter Integralregelung. Abb. 3.3 zeigt die Prinzipschaltung des intrazellulären Voltage-Clamp, der Schalter S dient dabei zum wahlweisen Einschalten der Integralregelung.

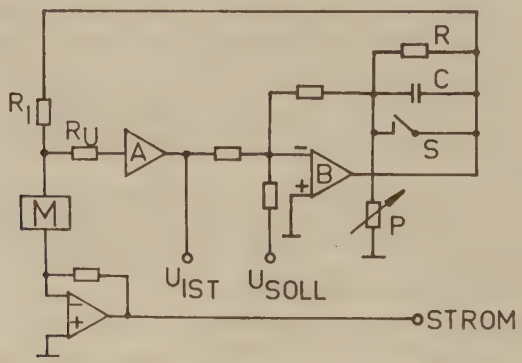


Abb. 3.3 Prinzipschaltung des intrazellulären Voltage-Clamp. M: Membran; RI, RU: Strom- bzw. Spannungselektrode;
A: Vorverstärker; B: Regelverstärker; C,P,R,S: Netzwerk der Integralregelung gemäß Abb. 3.2.B. Die Außenseite der Membran ist über einen als I-V-Konverter geschalteten Operationsverstärker geerdet.

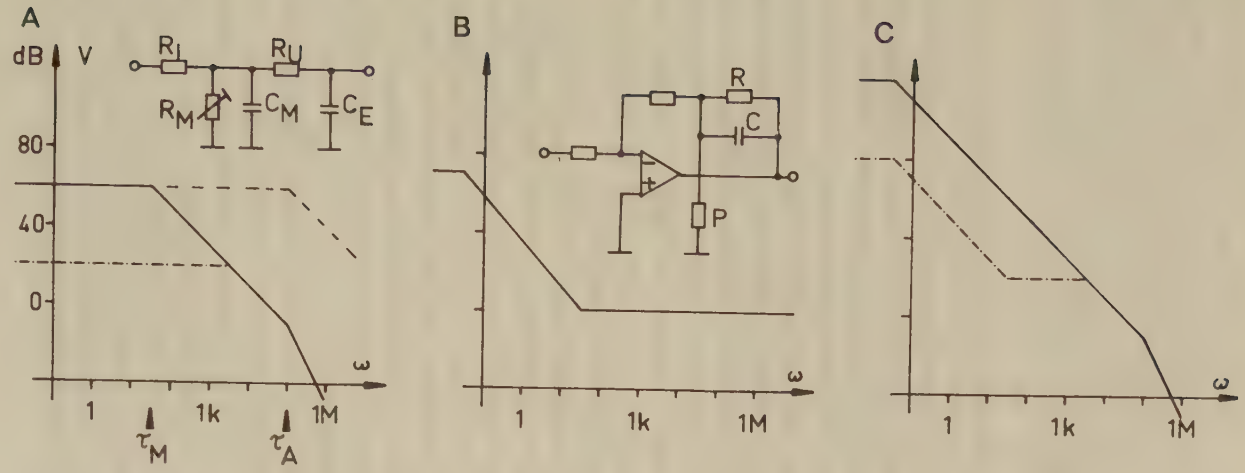


Abb. 3.4 Bode-Diagramme des intrazellulären Voltage-Clamp. A: Herkömmlicher Clamp, ---- Vorverstärker, —— Clamp bei ruhender Membran, —·—·— Clamp bei erregter Membran; RI, RU, RM: Widerstände der Strom- und Spannungs-Elektrode sowie der Membran.
CM, CE: Membran- bzw. Verstärker-Eingangs-Kapazität. B: Diagramm des Netzwerkes zur Integral-Regelung.
R, C fest, P variabel zur Einstellung der Eckfrequenz auf $1/\tau_M$.
C: —— Clamp mit Integralregelung bei ruhender Membran bzw. —·—·— bei erregter Membran.

3.4. Somastrommessung

Bei der Methode nach Neher und Lux (1969) wird der Strom durch ein begrenztes, geometrisch definiertes Stück der Gesamtmembran mittels einer auf diesen "Patch" aufgesetzten Halbmikro-Glaspipette von ca. 50 - 150 µm Durchmesser gemessen. Diese bewährte Methode sollte in zwei Punkten verbessert werden:

1) Verminderung der restlichen Axonartefakts durch exakteren Abgleich des Pipetteninnenwiderstandes.
2) Vereinfachte Herstellung und verbesserte Reinigungsmöglichkeit der Pipette.

Das primäre Problem der lokalen Strommessung besteht darin, daß auch bei exaktem Aufsetzen des Glaskörpers auf die kugelige Zelle der Leckwiderstand zwischen dem Inneren der Pipette und dem den Rest der Zelle umgebenden Bad nie größer als etwa 0.5 MOhm wird, unter normalen Bedingungen aber eher noch unter 100 kOhm liegt. Dieser Widerstand R_L muß als gegeben hingenommen werden, wenn man von einer Superfusion von Zelle und Pipette mit einer nichtleitenden Flüssigkeit absieht, wie sie von Fishman (1975) erfolgreich am Tintenfisch-Axon angewendet wurde. Der Grund für diese schlechte Abdichtung ist sicher darin zu sehen, daß die eigentliche Membran noch von einer dichten Hülle von Bindegewebe und Mikro-Glia-Zellen umgeben ist (Bocharova et al. 1975, Kreutzberg und Lux 1978). Eine weitergehende Präparation ist jedoch ohne Zerstörung der Zelle nicht möglich.
Um den Fehlstrom durch diesen gegebenen Leckwiderstand zu vermindern, bleibt also nur die Möglichkeit, die Potentialdifferenz zwischen beiden Seiten des Pipettenrandes unter allen Umständen ninimal zu halten. In der Neher'schen Anordnung wird hierzu eine Brückenschaltung verwendet, die nur dann abgeglichen werden kann, wenn das Verhältnis von Somastrom zu Gesamtstrom (also einschließlich dem axonalen Strom) unter allen Bedingungen konstant ist. Aufgabe der Somastrommessung ist es jedoch, gerade auch bei stark ungleichem Verhalten beider Größen den nichtgewünschten axonalen Anteil vom Meßsignal fernzuhalten.
Eine mögliche Lösung besteht darin, mit einer separaten Elektrode, die gleichzeitig als Referenzelektrode für den intrazellulären Clamp dienen kann, das lokale Potential unmittelbar am Außenrand der Pipette zu messen, und diesem das Potential der Pipetten-Innenseite auf elektronischem Wege nachzuführen. Praktisch ist es leicht möglich, eine gewöhnliche, möglichst niederohmige Mikroelektrode unter Mikroskopkontrolle bis auf etwa 5 µm an den äußeren Rand der Pipette zu justieren.
Aus geometrischen Gründen ist der überwiegende Teil des Längswiderstandes der Pipette in den ersten ca. 100 µm hinter der Pipettenöffnung konzentriert. Bei der

Neher'schen Anordnung, die im wesentlichen einen Potentiostaten für den Ort der dort verwendeten Potentialelektrode darstellt, ist prinzipiell ein merklicher Teil des Pipetten-Innenwiderstandes nicht kompensierbar, da diese Potentialelektrode immer gegenüber der eigentlichen Öffnung zurückversetzt ist, bei der von Neher verwendeten Zweikammerpipette beispielsweise 20 bis 50 µm (Neher 1970).
Eine weitergehende Kontrolle scheint bei der Pipettenkonstruktion nach Daut (1973a) möglich. Seine Konstruktion ist jedoch besonders anfällig gegen Verschmutzung der Öffnung, zudem wird diese durch die Art der Fixierung der Potentialelektrode noch zusätzlich verkleinert. Es wurde daher ein anderer Weg eingeschlagen, der gleichzeitig auch die zweite der oben gestellten Forderungen erfüllt.
Im Gegensatz zu den zur intrazellulären Ableitung verwendeten Mikroelektroden verhält sich der Widerstand der Flüssigkeitssäule der Halbmikro-Pipetten von 50 - 150 µm Durchmesser rein ohmsch und ist durch die geometrischen Abmessungen sowie die spezifische Leitfähigkeit der Ringer-Füllösung fixiert. Da der Pipettenstrom als eigentliches Meßsignal der Versuchsanordnung sowieso mit hoher Genauigkeit gemessen wird, läßt sich der Spannungsabfall in der Pipette einfach berechnen und elektronisch kompensieren.

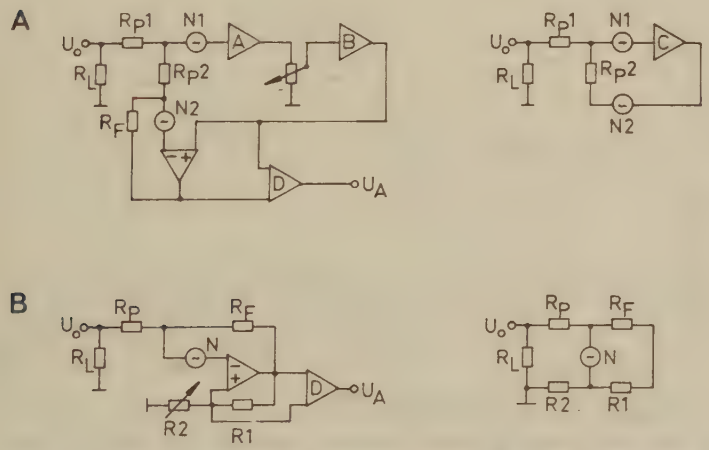


Abb. 3.5 Prinzip- und Rausch-Ersatz-Schaltbilder der Somastrom-Messung. A: Anordnung nach Neher (1970). B: Neue Anordnung. U_o: Potential an der Öffnung der Pipette; UA: Stromproportionale Ausgangsspannung; N, N1, N2: Äquivalente Rauschspannungsgeneratoren der Verstärkereingänge; RP1 + RP2 bzw. RP: Innenwiderstand der Pipette; RL: Leckwiderstand der nicht idealen Abdichtung der Pipette; RF: Rückführungswiderstand, der den I-V-Konversionsfaktor der Anordnung bestimmt; R1, R2: Variabler Spannungsteiler der Anordnung B zum Abgleich des effektiven Pipetten-Eingangswiderstandes.

In der Schaltung nach Abb. 3.5.B wird das Potential am Verbindungspunkt des Pipettenwiderstandes R_P mit dem Rückführungswiderstand R_F des Operationsverstärkers, der durch eine Ag/AgCl-Halbzelle gebildet wird, stets so geregelt, daß der effektive Eingangswiderstand von dem mit U_o bezeichneten Punkt aus nur noch

$$R_P - \frac{R_2}{R_1} \cdot R_F$$

beträgt (ohne Berücksichtigung des Leckwiderstandes R_L).

Bei Abgleich von R_2 auf den Wert $R_1 \cdot \frac{R_P}{R_F}$ wird der effektive Innenwiderstand der Pipette zu Null, d.h. das Potential U_o an der Pipettenspitze wird unabhängig vom Stromfluß. Die Isopotentialität der in Abb. 3.5.B als geerdet gezeichneten Fußpunkte von R_L und R_2 wird erreicht durch Anschluß der Referenzelektrode, deren Spitze sich unmittelbar am Außenrand der Pipette befindet, über einen als Impedanzwandler dienenden Pufferverstärker direkt an R_2. Die Effektivität dieser Anordnung

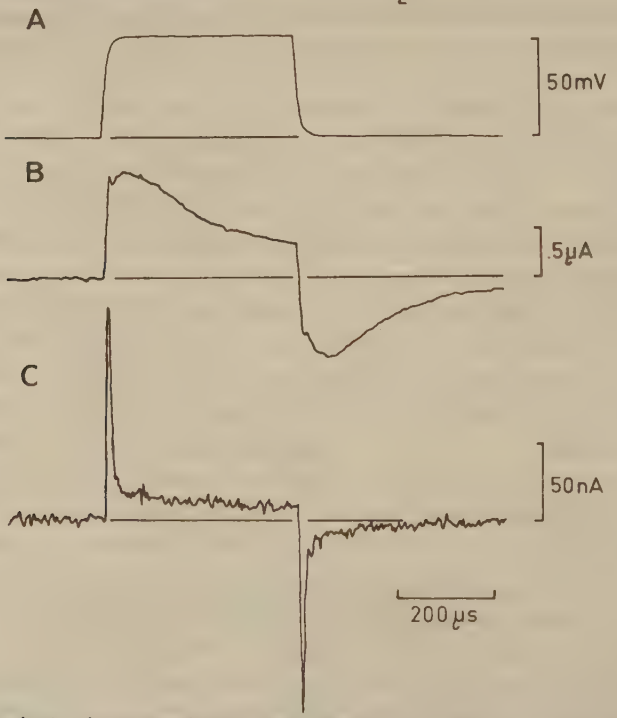


Abb. 3.6 Typische Ausgangssignale des Clamp bzw. der Strommessungen. A: Potentialverlauf bei rechteckförmigem Potentialsprung. B: Durch den Potentialsprung induzierter Badstrom. Der langsam abklingende Stromfluß nach Erreichen konstanter Potentialwerte wird durch die Umladung des Axons hervorgerufen. C: Gleichzeitig mit der Pipette gemessener Somastrom. Die kapazitive Spitze ist auf die Zeit der Umladung der Somamembran beschränkt.

zeigen die Gegenüberstellungen von gleichzeitig aufgenommenen Bad- und Pipettenströmen in Abb. 3.6 und 3.7. Im besonders kritischen Gebiet kleiner Depolarisationen (Abb. 3.7.A) wird das Bild des Badstromes im wesentlichen von axonalen Aktionspotentialen bestimmt, während diese in der Somastrommessung vollständig unterdrückt sind, so daß der persistierende Einwärtsstrom der Somamembran (Eckert und Lux 1976) ebenso wie der transiente Auswärtsstrom beim Zurückklemmen auf das Ruhepotential (s. Kap. 4.1) gut aufgelöst sind. In dem in Abb. 3.7.B gezeigten Fall ist die

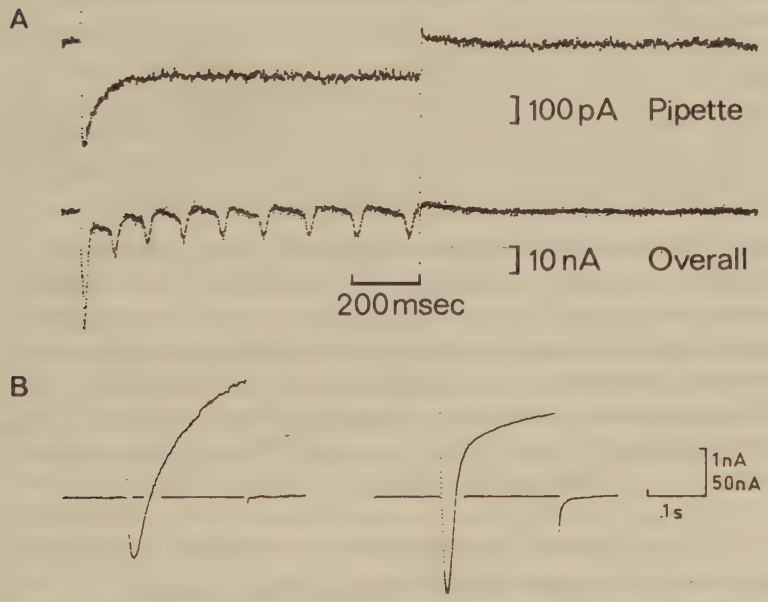


Abb. 3.7.A: Vergleich von Somastrom (oben) mit Badstrom bei einer Depolarisation auf -24 mV. Im Badstrom verdecken die Axonartefakte weitgehend den persistierenden Einwärtsstrom. B: Vergleich von Somastrom (links) mit Badstrom bei einer Depolarisation auf +10 mV. Der glatte Obergang von Einwärts- zu Auswärtsstrom ist im Badstrom durch den Axonartefakt verzerrt.

Differenz weniger drastisch, doch zeigt der Strom der Somamembran einen wesentlich glatteren Obergang zwischen primärem Einwärtsstrom und Auswärtsstrom, wie er sich später auch aus dem unter Kap. 5.3. besprochenen kinetischen Modell ergibt.

Die Herstellung der Pipetten-Glaskörper erfolgt nach der Methode von Neher (1970), wobei als Ausgangsmaterial Kapillaren aus Pyrexglas mit den Abmessungen Außendurchmesser 4 mm, Wandstärke 1 mm verwendet wurden. Als Ag/AgCl-Halbzelle wurden gesin-

terte Bioelektroden (Annex-Instruments, Kalifornien) in Form kleiner Zylinder von 1.8 mm Durchmesser und 3 mm Länge verwendet. Bei Strömen von bis zu 100 µA ist die garantierte maximale Polarisation dieser Systeme kleiner als 4 µV, also bei den an den Helix-Zellen gemessenen Patch-Strömen von maximal 200 nA vernachlässigbar. Diese Elektroden werden im vorderen Teil der Pipetten mit Klebewachs (Deiberit) fixiert, ihre exakte Positionierung in Längsrichtung der Pipette erwies sich dabei als durchaus unkritisch. Die empfindliche vordere Öffnung der Pipette ist völlig frei von irgendwelchen Elektroden, sie läßt sich daher bei Verschmutzung durch etwa anhaftende Gewebeteilchen leicht reinigen. Im Gegensatz zu den bei den früheren Konstruktionen verwendeten extrem feinen Spitzen in unmittelbarer Nähe der Zelloberfläche ist hier durch Größe und Plazierung der Ag/AgCl-Halbzelle eine Vergiftung der Elektrode durch Proteine ausgeschlossen (Tasaki und Singer 1968, Gesteland et al. 1959). Unter konstanten Bedingungen von Temperatur und ionaler Zusammensetzung der Badeflüssigkeit erwies sich diese Anordnung als ausgezeichnet stabil.

Bezüglich des Signal-Rauschabstandes ist die Pipetten-Strommessung prinzipiell ungünstiger als die Badstrommessung. Da das Potential im Innern der Pipette immer mit dem Rauschen des verwendeten Verstärkers behaftet ist, fließt ein entsprechender Rauschstrom durch den schon erwähnten Abdicht-Widerstand von stets weniger als 0.5 MOhm. Abb. 3.5 zeigt die Prinzip- und Ersatzschaltbilder der beiden möglichen Anordnungen mit den hauptsächlichen Rauschspannungsquellen. Der Eingangsrauschstrom der verwendeten FET-Verstärker ist mit 0.1 pA_{ss} so gering, daß er zu vernachlässigen ist. Das theoretische Minimum des Rauschstroms ist also $I_N = \frac{N}{R_L + R_p}$,

wobei N die auf den Eingang bezogene Rauschspannung des Verstärkers ist (ca. 2 μV_{ss}).

Bei voller Kompensation des Pipetten-Innenwiderstandes, also Abgleich auf $R_2 = R_1 \cdot \frac{R_p}{R_F}$ entspricht das differentiell über R_1 gemessene Rauschsignal einem Rauschstrom $I_N' = N \cdot \left(\frac{1}{R_L} + \frac{1}{R_F} + \frac{R_p}{R_L \cdot R_F} \right)$

wie aus der in Abb. 3.5.B gezeichneten Ersatzschaltung hervorgeht. Die Vergrößerung des Rauschstroms durch die Kompensation des Pipetten-Innenwiderstandes beträgt bei den typischen Werten von R_L = 100 kOhm und R_p = 20 kOhm sowie dem verwendeten R_F = 1 MOhm mit

$$I_N' = N \cdot 1.12 \cdot 10^{-5} \text{ A}$$

ca. 10% des theoretischen Minimums. Der Hauptanteil des zusätzlichen Rauschens rührt

dabei vom Term $1/R_F$ her, der durch die niederohmige Abnahme des Signals über R1 hereinkommt und prinzipiell durch Anschluß eines Differenzverstärkers direkt über R_F umgangen werden könnte. Der genau gleiche Ausdruck ergibt sich für das Rauschen der Neher'schen Anordnung, wenn dort der nicht kompensierbare Anteil $R_{P1} = 0$ gesetzt und die Verstärkung von A und B sehr hoch gewählt wird, d.h. ebenfalls der gesamte Innenwiderstand der Pipette neutralisiert wird.

3.5. Bestimmung des Membranserienwiderstandes

Eine der wesentlichen Methoden dieser Arbeit besteht in der Anwendung relativ sehr hoher Depolarisationen der Membran um mehr als 200 mV, während denen entsprechend hohe Ionenströme fließen können. Dabei wird durch die Regelung der Elektronik des intrazellulären Clamps zwar die Potentialdifferenz zwischen der intrazellulären und der extrazellulären Elektrode exakt konstant gehalten, das eigentliche Membranpotential kann jedoch kleiner sein, falls der mit der Membran in Serie liegende Widerstand der Badelösung, des Zellplasmas sowie von Bindegewebe und umgebenden Glia-Zellen eine mit dem Membranwiderstand selbst vergleichbare Größenordnung erreicht.
Zur Bestimmung dieses Widerstandes sind verschiedene Methoden entwickelt und mit unterschiedlichen Ergebnissen an Somamembranen angewendet worden. Hodgkin et al. (1952) bestimmten den Serienwiderstand am Tintenfisch-Axon aus der Abklingphase des kapazitiven Stromartefakts im Voltage-Clamp, die auf die gleiche Art an Schnecken somazellen gewonnenen Werte (Meech und Standen 1975) liegen jedoch mit Sicherheit wesentlich zu hoch, da die kapazitive Stromspitze bei diesem Präparat durch die Aufladung des Axons enorm verbreitert ist (siehe dazu auch Abb. 3.7 und Eckert und Lux 1976). Eckert und Lux erhielten durch Anwendung dieser Methode auf den kapazitiven Artefakt der Somastrom-Messung den wesentlich niedrigeren Wert von 6 - 10 kOhm für eine Zelle von 120 $\mu m\emptyset$.
Eine sehr direkte Methode zur Bestimmung des Serienwiderstandes besteht in der Injektion eines kurzen, sehr steilen hyperpolarisierenden Strompulses in die Zelle mit Messung des momentanen Spannungssprungs zum Zeitpunkt t = 0 als Extrapolation aus der bei konstantem Strom linearen Rampe der Aufladung der Membran-Kapazität (Binstock et al. 1975). Die vorhandene Elektronik wurde zu diesen Messungen nach Abb. 3.8.A als Stromklemme verwendet und der Strompuls über einen nicht eingezeichneten 10 MOhm Widerstand direkt am Eingang des Badstromwandlers injiziert.

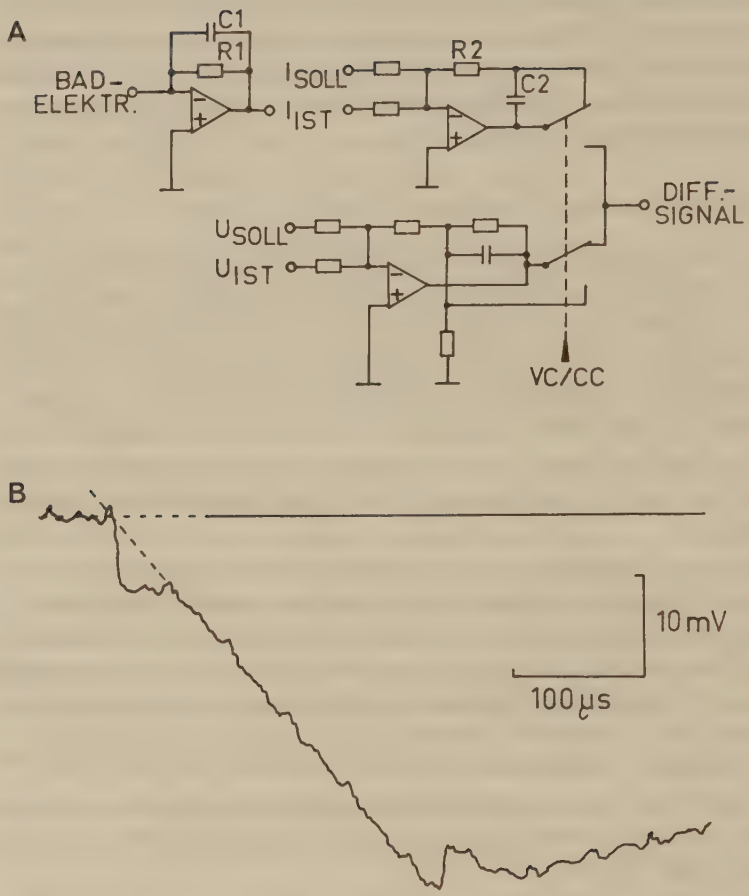


Abb. 3.8.A: Prinzip der Umschaltung zwischen Spannungsklemme und Stromklemme. Der Umschalter ist ein Halbleiter-Schalter (National Semiconductor AH 0014). In der oberen Regelschleife (Stromklemme) gilt C1 · R1 = C2 · R2. In der unteren Regelschleife (Spannungsklemme) sind die Elemente der Integralregelung gemäß Abb. 3.2.B mit eingezeichnet. Das Differenz-Signal bestimmt nach weiterer Verstärkung die an die Strom-Elektrode angelegte Spannung. B: Ausgangssignal des Vorverstärkers bei Injektion eines rechteckförmigen Strompulses in ein Neuron ohne meßbaren Serienwiderstand.

Abb. 3.8.B zeigt das typische Ausgangssignal des intrazellulären Potentials bei einem Strompuls von 500 nA und 250 µs Dauer. Nach einem anfänglichen Artefakt von etwa 50 µs, der durch die trotz Abschirmung unvermeidliche kapazitive Kopplung zwischen Strom- und Spannungselektrode entsteht, wird die Membrankapazität mit einer Steilheit von 147 V/s aufgeladen. Dieser Wert entspricht einer Zellkapazität von 3.4 nF. Die auf t = 0 extrapolierte Spannungsspur läßt bei dieser Messung keinerlei merklichen Serienwiderstand erkennen. Bei insgesamt 6 gemessenen Zellen mit Durchmessern zwischen 150 µm und 240 µm ergab sich ein mittlerer Wert des Serienwiderstandes von 5.5 $\pm$ 4.7. kOhm.

Durch Multiplikation mit den in jedem Fall gemessenen Auswärtsströmen bei hohen depolarisierenden Clamp-Pulsen ergab sich in allen Fällen ein durch den Serienwiderstand bedingter maximaler Spannungsabfall von weniger als 10 mV. Er wäre im Prinzip leicht zu kompensieren (Meech und Standen 1975). Für die in dieser Arbeit vorgelegten Messungen wurde jedoch darauf verzichtet, da der Effekt offensichtlich sehr klein ist. Im Obrigen könnten alle für die Schlußfolgerungen aus dieser Arbeit wesentlichen Untersuchungen zum negativen Widerstand auf der Strom-Spannungs-Kennlinie der Membranen durch eine Kompensation des Serienwiderstands nur noch mehr bekräftigt werden.

3.6. Temperaturmessung und -Regelung

Die Temperatur des Ringerbads wird mit einem glasgekapselten NTC-Widerstand (Siemens M812) gemessen, dessen thermische Zeitkonstante in Wasser mit 0.8 s hinreichend kurz ist für den Einsatz in einer Temperaturregelschleife. Die Widerstandscharakteristik solcher Thermistoren ist nicht linear, sondern von der Form

$$R_T = A \cdot e^{B/T}.$$

A und B sind Konstanten, die von Größe und Material bestimmt werden. Die für die beabsichtigte Regelung benötigte Linearisierung des Temperatursignals erfolgt mit einer analytischen Methode, die nur drei Eichpunkte erforderlich macht und im Temperaturbereich zwischen 0°C und 30°C ein um weniger als .01 K von der Geraden abweichendes Signal liefert.
Durch logarithmieren des von der konstanten Spannung U_0 bewirkten Stroms durch den Thermistor

$$I_T = \frac{U_0}{R_T} = \frac{U_0}{A \cdot e^{B/T}}$$

mittels eines in Vorwärtsrichtung gepolten pn-Obergangs wird eine Spannung

$$U_L = \ln I_T = \ln \frac{U_o}{A} - \frac{B}{T}$$

erzeugt. Zur Korrektur der Restkrümmung wird ein Widerstand R_K in Serie mit dem logarithmierenden pn-Übergang geschaltet, so daß man schließlich erhält

$$U_T = \ln \frac{U_o}{A} - \frac{B}{T} + R_K \cdot \frac{U_o}{A} e^{-B/T}$$

Bei Entwicklung von U_T um $T_o = 15^oC$ haben die vom 2. bzw. 3. Term herrührenden quadratischen Glieder umgekehrtes Vorzeichen. Bei geeigneter Dimensionierung von R_K heben sie sich gerade auf und man erhält mit B = 4000 K näherungsweise (unter Vernachlässigung der Konstanten)

$$U_T = \Delta T \cdot (1 + 4.37_{-5} \cdot \Delta T^2)$$

Zur Elimination von Einflüssen der Umgebungstemperatur auf die logarithmische Umwandlung wird das Substrat der dazu verwendeten Transistoren (Silicon General SG3821) auf eine konstante Temperatur von etwa 70^oC aufgeheizt, wobei der gegenläufige Temperaturkoeffizient der Diodendurchflußspannung und der Dioden-Durchbruchspannung (Zenerspannung) ausgenutzt wird.

Als Stellglied der Temperatur-Regelstrecke wird ein ringförmiges Peltier-Element (Cambridge Thermionic Corporation, Typ 800-3953-3) verwendet. Gegenüber den früher üblichen Anordnungen mit einem Kühlwasserkreislauf um das Präparat bietet es den Vorteil wesentlich schnellerer und damit auch exakterer Regelung, sowie einen einfacheren Aufbau durch Fortfall der Kühlschlange, die überdies häufig eine Quelle unkontrollierbarer Brummeinstreuung auf die Badstrommessung war.

Bei einer Wärmeübergangszahl von etwa 1 mW/cm^2K (Bosch techn. Taschenbuch 1954), die Konvektion und Wärmeleitung einer horizontalen Fläche in Luft erfaßt, und einer angestrebten maximalen Temperaturdifferenz zur Umgebung von 25 K müssen bei der durch die Konstruktion des Experimentierbeckens gegebenen effektiven Oberfläche der zu kühlenden Teile von 26 cm^2 bis zu 660 mW gepumpt werden. Aus den Herstellerangaben ist zu entnehmen, daß das Peltier-Element diese Leistung noch bei einer Temperaturdifferenz von 50 K pumpen kann, wobei die abzuführende Wärmemenge 10 W beträgt. Es ist somit ein thermischer Widerstand von bis zu 2.5 K/W der heißen Seite des Peltier-Elements gegen die Umgebung zulässig. Dies erfordert nicht die übliche Wasserkühlung, sondern wird durch drei sonst für Leistungshalbleiter verwendete Aluminium-Kühlkörper (1 Stck. K1.1; 2 Stck. K3 nach DIN 41882) erreicht, wodurch sich ein rechnerischer thermischer Widerstand von .63 K/W ergibt.

In der Praxis können die tiefsten verwendeten Badtemperaturen auch bei sommerlichen Außentemperaturen über Stunden hinweg eingehalten werden.

Die Steuerung des Peltier-Elements erfolgt über einen Leistungs-Verstärker, der von einem Regler mit PID-Charakteristik angesteuert wird. Die optimale Regelverstärkung sowie die Zeitkonstanten der I- und D-Anteile wurden empirisch auf schnellstes Ansprechen bei geringstem Überschwingen eingestellt. Um ein zunächst vorhandenes starkes Überschießen der Temperatur bei Temperaturerhöhungen zu vermeiden, mußte der stark unterschiedliche Wirkungsgrad des Peltier-Elements beim Betrieb als Kühler bzw. als Wärmepumpe durch unterschiedliche Regelverstärkung in beiden Betriebsarten ausgeglichen werden.

3.7. Druckinjektion

Um die Wirkung der divalenten Ionen auf der Innenseite der Membran untersuchen zu können wurde eine Methode zur Injektion des gewünschten Ions in die Zelle benötigt. Die am häufigsten für diesen Zweck verwendete Iontophorese ist dabei speziell zur Injektion von Puffergemischen zweier Substanzen, wie z.B. dem System Ca-EGTA, wenig geeignet, da die im Gleichgewicht vorhandenen Reaktionspartner aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung verschiedene Transportzahlen aufweisen, so daß zwischen den Konzentrationen in der Elektrodenfüllösung und den entsprechenden Anzahlen injizierter Ionen große Unterschiede bestehen können.
Für solche Fälle bietet sich dagegen die Druckinjektion an. Da nach der Gleichung von Hagen-Poiseuille bei gegebenem Druck die durchströmende Menge der vierten Potenz des Öffnungsradius proportional ist, ist jedoch speziell bei sehr kleinen Spitzendurchmessern, wie sie zur intrazellulären Injektion notwendig sind, eine Kalibrierung der Kapillaren durch Ausmessen der Spitzendurchmesser nicht möglich. Die Erfahrung zeigt überdies, daß die Spitzen der Pipetten bei der Penetration von Zellen durch Gewebeteilchen und Proteine auch völlig blockiert werden können. Zur quantitativen Kontrolle der injizierten Menge wurde daher eine von Llinas et al. (1972) angegebene Methode weiter verbessert.
Die wässrige Injektionslösung wird mit einer hydrophoben Flüssigkeit dergestalt überschichtet, daß eine sichtbare Phasengrenze entsteht. Wenn der Querschnitt dieses Meniskus hinreichend klein ist, läßt sich seine Verschiebung während der Injektion von Mengen selbst im pl-Bereich ohne weiteres im Mikroskop beobachten und mit einem Okularmikrometer ausmessen (Abb. 3.9.B).

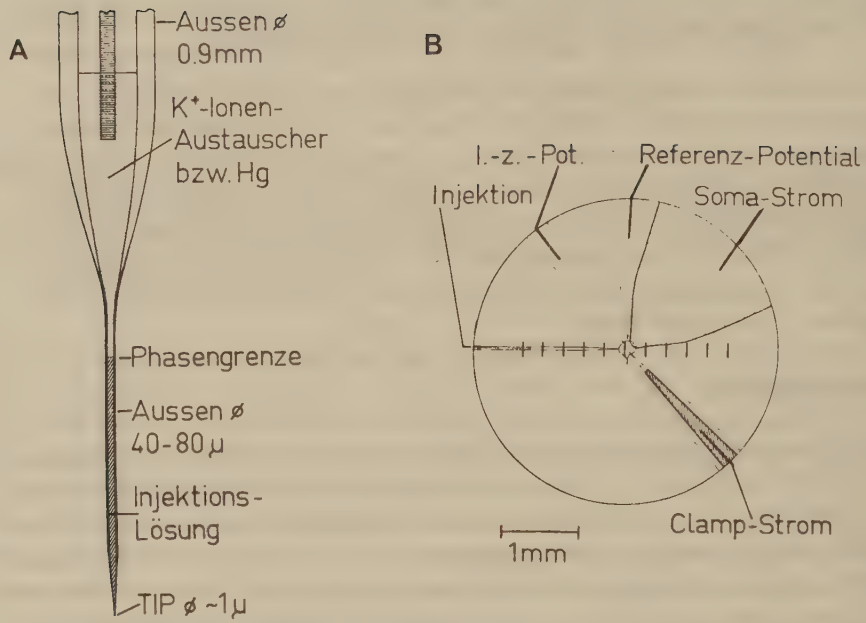


Abb. 3.9.A: Querschnitt einer Pipette zur Druckinjektion.
B: Schematische Darstellung eines Injektionsexperimentes, durch das Meßokular der Stereolupe bei 50-facher Vergrößerung gesehen.

Eine ausgezeichnet sichtbare Grenzschicht ergibt sich bei Verwendung von Öl, das mit dem Farbstoff Sudan IV leicht intensiv rot gefärbt werden kann. Durch das isolierende Öl ist jedoch keine elektrische Verbindung zur Elektrodenspitze mehr möglich, so daß im Experiment die Kontrolle einer erfolgreichen Penetration durch Beobachtung des Elektrodenpotentials nicht möglich ist. Als elektrisch leitende und dennoch hydrophobe Phase wurde daher später flüssiger Ionenaustauscher verwendet, der sonst zur Herstellung K^+-sensitiver Mikroelektroden benutzt wird. Aufgrund der relativ geringen spezifischen Konduktivität dieses Mediums haben die so hergestellten Injektionselektroden trotz Spitzendurchmessern von ca. 2 µm Widerstände bis etwa 100 MOhm. Dies ist jedoch ausreichend, um mit einem einfachen Ableitverstärker die Penetration der Zellen durch Beobachtung des Elektrodenpotentials zu überprüfen. Durch diese Kontroll-Möglichkeit wurden die Injektionsexperimente ganz erheblich erleichtert.

Zusätzlich konnte so durch Vergleich der gleichzeitigen Messungen des Membranpotentials mit der Injektionselektrode sowie der normalen, KCl-gefüllten Potentialelektrode die in Kap. 3.2. diskutierte Isopotentialität der Somamembran überprüft werden. Es zeigte sich, daß in allen Fällen die Membranpotentiale am Ort der Potentialelektrode sowie an der etwa gegenüber liegenden Injektionspipette exakt gleich waren.

Zur genaueren quantitativen Bestimmung der injizierten Menge wurde den Pipetten eine spezielle Form gegeben, die an der Stelle des bewegten Meniskus einen konstanten Querschnitt aufweist. Das Ausgangsmaterial (Pyrex-Glas, Außendurchmesser 0.9 mm, Wandstärke 0.2 mm) wird dazu aud einem leicht modifizierten horizontalen Mikroelektrodenziehgerät (Industrial Science Inc.) in einem ersten Schritt so ausgezogen, daß eine Halbmikrokapillare von etwa 15 mm Länge und nahezu zylindrischer Form bei einem Durchmesser von etwa 50 μm entsteht. Die eigentliche Spitze wird erst danach in einem zweiten Schritt nach erneuter Zentrierung in der Heizwendel und bei wesentlich geringerer Temperatur gezogen.
Die Füllung der Elektrode mit dem Ionenaustauscher erfolgt von hinten mit einer feinen Injektionsnadel. Dabei füllt sich die Spitze entweder nach kurzer Zeit spontan oder durch kurzes Anlegen von 5 - 10 bar Überdruck. Unter Mikroskopkontrolle wird die so vorgefüllte Pipette nun in eine Küvette mit der wässrigen Injektionslösung abgesenkt und diese mit Unterdruck durch die Spitze angesaugt. Es erwies sich als zweckmäßig, die Küvetten jeweils erst am Tag der Elektrodenherstellung direkt durch ein feinporiges Zellulosénitratfilter (Sartorius Membranfilter GmbH, Cat.Nr. 11306, Porengröße 0.45 μm) zu füllen. Eine Menge von 5 nl läuft dann in etwa einer Minute ein. Am Ende des Füllvorganges befindet sich die sichtbare Phasengrenze am oberen Ende des zylinderförmigen Teils der Elektrode. Zum Experiment wird die Elektrode in einem Halter druckdicht verschraubt, wobei ein Platindraht die elektrische Verbindung zur Ionenaustauschersäule herstellt.
Abb. 3.9.A zeigt den Querschnitt der beschriebenen Anordnung. Die Führung des Halters in einem Leitz-Mikromanipulator erfolgt so, daß die Elektrode um 30^{0} zur Horizontalen geneigt ist, bei der senkrecht von oben gemessenen Meniskusverschiebung ist daher der Faktor $(\cos 30^{0})^{-1} \approx 1.15$ berücksichtigt.
Die Steuerung des Injektionsdrucks erfolgt über eine aus Reiniger, Druckregler und Magnetventil bestehende Einheit, die mit handelsüblichen Pneumatik-Bauteilen (Robert Bosch GmbH) aufgebaut ist. Sie wird aus dem Druckluftnetz des Hauses mit bis zu 10 bar versorgt.

Injiziert wird mit Druckstößen von 50 - 200 ms Dauer. Sie werden manuell bei gleichzeitiger optischer Kontrolle des Meniskus im Mikroskop ausgelöst, wobei die Zeitdauer von einer einstellbaren monostabilen Kippstufe bestimmt wird. Diese wie auch der Druck hinter dem Regler werden unmittelbar vor dem Einstich der Elektrode in die Zelle so eingestellt, daß ein Druckstoß eine gerade eben sichtbare Verschiebung von 5 μm des Meniskus bewirkt. Bei 50 μm Innendurchmesser der Kapillare entspricht dies einer Auflösungsgrenze der kontrollierten Injektion von etwa $\pm$10 pl. Die im Experiment bei einzelnen Injektionen injizierte Menge betrug i.A. etwa 1% des Zellvolumens, d.h. etwa 100 pl.
Während die Injektion von Lösungen der Ca-Komplexbildner EGTA oder EDTA (siehe Kap. 4.4) praktisch keine Schwierigkeiten macht, blockieren mit $CaCl_2$ gefüllte Elektroden in Injektionspausen oft schon nach wenigen Minuten oder auch nur Sekunden, wahrscheinlich durch Reaktion der Ca-Ionen mit Proteinen des Zellplasmas. Es erwies sich als nützlich, über den elektrischen Anschluß der Elektrode ständig einen negativen Strom von wenigen nA fließen zu lassen. Mit Hilfe dieser Maßnahme sind Injektionen von Ca auch noch bis zu über einer Stunde nach Penetration der Zelle möglich.

3.8. Registrierung, Bestimmung von Zeitkonstanten

Die Meßsignale des Bad- bzw. Pipettenstromes werden in Meßköpfen in unmittelbarer Nähe der Präparation mit Skalenfaktoren von 1 μA/V bzw. 10 nA/V in Spannungen umgewandelt. Diese werden dann soweit nachverstärkt, daß ihre Amplitude $\pm$ 4 V nicht überschreitet. Sie werden ebenso wie das 10-fach vorverstärkte Signal des Membranpotentials auf den Kanälen 1 - 3 eines frequenzmodulierten Magnetbandgerätes (Hewlett Packard 3960) aufgezeichnet. Der vierte Kanal wird zur Registrierung der Temperatur des Ringerbades und für Sprachkommentare benutzt. Das Bandgerät lief gewöhnlich mit 3"/s, bei einem Frequenzbereich von 0 - 1 kHz.
Zwischen den einzelnen depolarisierenden Meßpulsen sind Pausen von 20 - 30 s erforderlich, in denen beim Haltepotential von -40 bis -50 mV die Einflüsse des jeweils vorhergehenden Pulses auf die Konduktivität der Membran abklingen. Das Bandgerät wird daher erst unmittelbar vor jeder Messung gestartet und danach wieder gestoppt. Durch einen auf den Potentialkanal aufgebrachten Triggerimpuls kann es zur Auswertung dann automatisch ebenso stückweise abgespielt werden. Mit Hilfe eines Digital-Oszilloskops (Nicolet 1090) können die relevanten Werte entweder direkt abgelesen oder der Strom-Zeit-Verlauf über einen X-Y-Schreiber (Bryans 26 000) aufgezeichnet werden.

Schnelle Vorgänge, die mit dem Band nicht mehr aufzuzeichnen sind, wie bei der Messung des Membran-Serienwiderstandes, werden mit einer Registrierkamera (Grass Kymograph) direkt beim Experiment vom Schirm des Oszilloskops abfotografiert.
Zur Ermittlung der in 4.8. angegebenen Zeitkonstanten wurde ein gemischt elektronisch- graphisches Verfahren benutzt. Da im Allgemeinen mehrere verschiedene Stromkomponenten zum gemessenen Gesamtstrom beitragen, zeigt dieser auch dann über längere Zeiten keinen einfachen exponentiellen Verlauf, wenn dies für die einzelnen Ströme zutrifft. Eine Zeitkonstantenbestimmung auf die übliche Art durch Ausmessen diskreter Werte bzw. Tangentensteigungen ist dadurch unmöglich, insbesondere da nicht ohne weiteres zu sehen ist, an welchen Punkten die Messungen zweckmäßig vorzunehmen wären. Um dennoch zumindest angenäherte Werte zu erhalten, wurde von folgender Überlegung ausgegangen:
Für einen gewissen, a priori unbekannten Teil einer Strom-Aktivierungskurve sei der Verlauf durch

$$I(t) = I_0 \cdot (1-e^{-t/\tau}) + I_L$$

annähernd zu beschreiben, d.h. eine der beteiligten Komponenten mit rein exponentiellem Verlauf ist wesentlich größer als die anderen. Es gilt dann:

$$\frac{dI}{dt} = I_0 \cdot (\frac{1}{\tau} e^{-t/\tau})$$

sowie

$$\ln(\frac{dI}{dt}) = -\ln\tau + \ln I_0 - t/\tau$$

Durch Differentiation und Logarithmierung erhält man also eine Gerade mit der Steigung $-1/\tau$, wobei der unbekannte Wert des Leckstroms I_L sowie der ebenso unbekannte rechnerische Endwert I_0, der im Experiment durch die gleichzeitig einsetzende Inaktivierung i.A. garnicht erreicht wird, nicht mehr vorkommen. Das gleiche gilt prinzipiell für die Bestimmung von Abfallkinetiken nach dem Ansatz

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-t/\tau} + I_L$$

Mit Hilfe einer am Analogrechner Telefunken RA 710 programmierten Differenzierschaltung (Giloi und Herschel 1968) sowie anschließender Logarithmierung des differenzierten Signals mittels der bereits unter 3.5. beschriebenen Schaltung wurden die notwendigen Operationen auf das vom Magnetband kommende Stromsignal angewendet. Die Resultat-Kurve wurde dann mit dem digitalen Oszilloskop gespeichert und ausgemessen. Abb. 3.10 zeigt das Ergebnis dieser Rechnung bei Eingabe einer einfachen Aufladefunktion, die durch die Ansteuerung eines RC-Gliedes mit einem Rechteckimpuls direkt gewonnen wurde Die nutzbare Aussteuerung des Logarithmierers umfaßt etwa drei

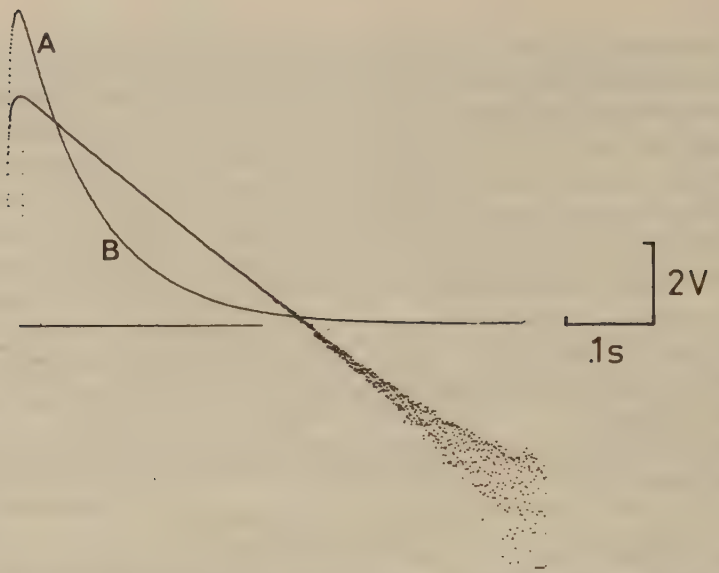


Abb. 3.10 Ausgangssignale der Differenzierschaltung (A) sowie der Logarithmierschaltung (B) bei Eingabe einer Aufladefunktion eines genau ausgemessenen RC-Gliedes, das zur Eichung der Auswerteschaltung verwendet wurde.

Dekaden des differenzierten Signals. Bei kleineren Signalen als 10 mV ist das Ausgangssignal dann bereits stark verrauscht.

Bei Eingabe der experimentellen Kurven ergab sich in den meisten Fällen ein hinreichend langes, annähernd gerades Teilstück, das eine Auswertung durch direktes Ausmessen der Steigung ermöglichte.

4. Ergebnisse

4.1. Einfache Depolarisationen

Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, daß die Konzentration des ionisierten, freien Kalzium intrazellulär extrem niedrig ist (Meech 1974, Owen et al. 1977, Christoffersen und Simonsen 1977).
Aufgrund der geringen Konzentrationen sind exakte Messungen zwar kaum möglich, doch scheinen Werte von weniger als 10^{-6} M/l gesichert. Wenn nun bei einer Depolarisation eine potentialabhängige Permeabilität für Kalzium-Ionen erzeugt wird, sind aufgrund des starken Konzentrationsunterschiedes auf beiden Seiten der Membran um etwa den Faktor 10^4 im gesamten physiologischen Potentialbereich Netto-Einwärtsströme von Ca-Ionen zu erwarten. Bei künstlichen, noch höheren Depolarisationen unter Voltage-Clamp-Bedingungen nimmt jedoch die Zahl der hinreichend energiereichen Ca-Ionen, die imstande sind, gegen das Potential anzulaufen, stark ab. Wenn weiter die unter physiologischen Bedingungen einströmenden Ca-Ionen die Konduktivität der Membran beeinflussen, so sollte sich die Unterdrückung dieses Einstroms durch Depolarisation auf solche und höhere Potentiale in den dabei gemessenen Clamp-Strömen bemerkbar machen.

Zu Beginn der Untersuchung wurden bei einer großen Zahl von Zellen in verschiedenen Teilen des Ganglions die Clamp-Ströme bis zu solchen hohen Depolarisationen aufgenommen, die obere Grenze des Potentials war dabei durch die Spannungsfestigkeit der Membran gegeben, die etwa bei 180 mV liegt (Johnson und Roots 1972). Bei noch höheren Depolarisationen stieg einerseits der zeitunabhängige Leckstrom (gemessen zur Zeit t=0 bzw. unmittelbar nach Abklingen des kapazitiven Artefakts) unverhältnismäßig stark an, zum anderen zeigte auch der zeitabhängige Verlauf des Stromes oft ein anomales Anwachsen im Verlauf des Clamp-Pulses. Nach solchen Depolarisationen war die Leck-Konduktivität häufig erhöht, doch erholten sich die meisten Zellen dann wieder im Laufe von einigen Minuten. Im Allgemeinen wurden die Membranen nur soweit depolarisiert, daß diese Erscheinungen gerade noch nicht auftraten.
Es zeigte sich sehr bald, daß die Zellen allein aufgrund der sich bei diesen Messungen ergebenden Scharen von Strom-Zeit-Verläufen in drei Typen eingeteilt werden können, die im weiteren aus noch näher erläuterten Gründen mit P, M und C bezeichnet werden. Die Grenzen zwischen diesen Typen-Klassen sind allerdings fließend.

Zellen des P-Typs zeigen einen mit steigender Depolarisation monoton ansteigenden Auswärtsstrom, wobei die Anstiegskinetik offensichtlich ebenso monoton schneller wird. Im Verlauf der in Abb. 4.1.1.B gezeigten 1 s-Pulse ist eine ausgeprägte In-

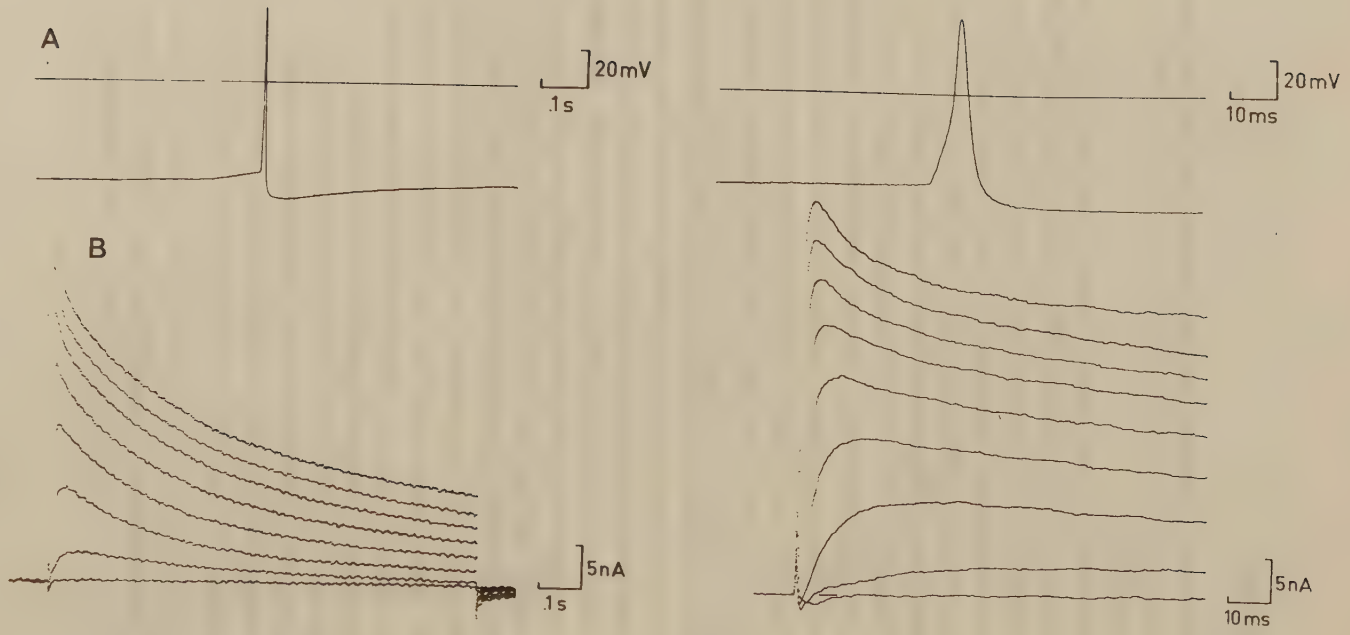


Abb. 4.1.1 Aktionspotential (A) und Clampströme (B) einer Zelle des P-Typs, rechts jeweils mit größerer Zeitauflösung. Depolarisationen in B von -20 bis +120 mV in Schritten von 20 mV ansteigend; Haltepotential -60 mV.

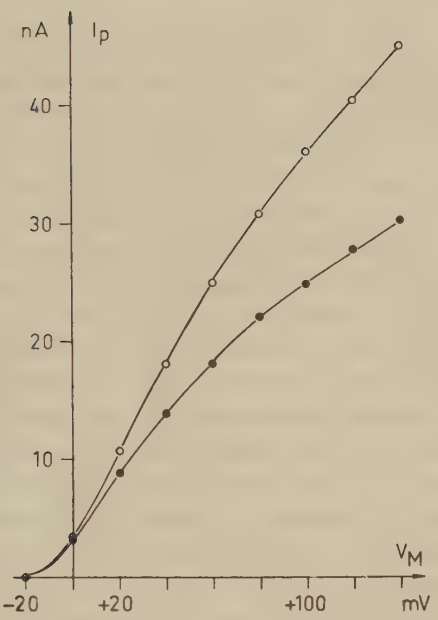


Abb. 4.1.2 I-V- Kurven einer Zelle des P-Typs. Maximale Ströme (o) bzw. isochrone Werte nach 100 ms (●).

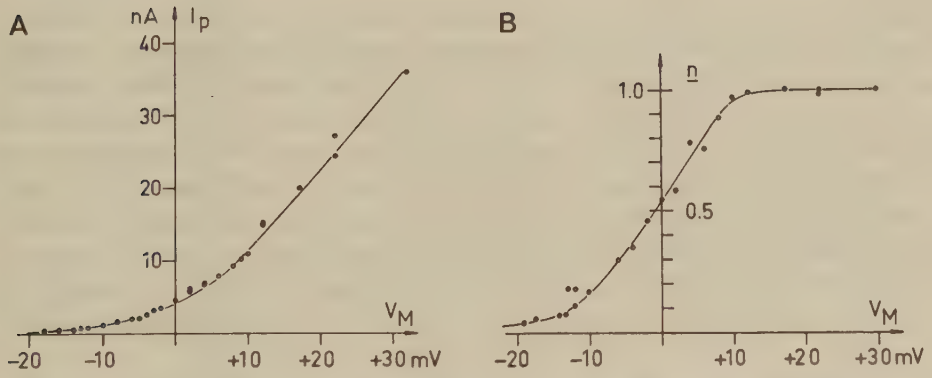


Abb. 4.1.3.A: I-V-Kurve im Anschaltbereich einer Zelle des P-Typs (Strommaxima).
B: Verlauf des Aktivierungsparameters n des Auswärtsstroms bei der gleichen Zelle.

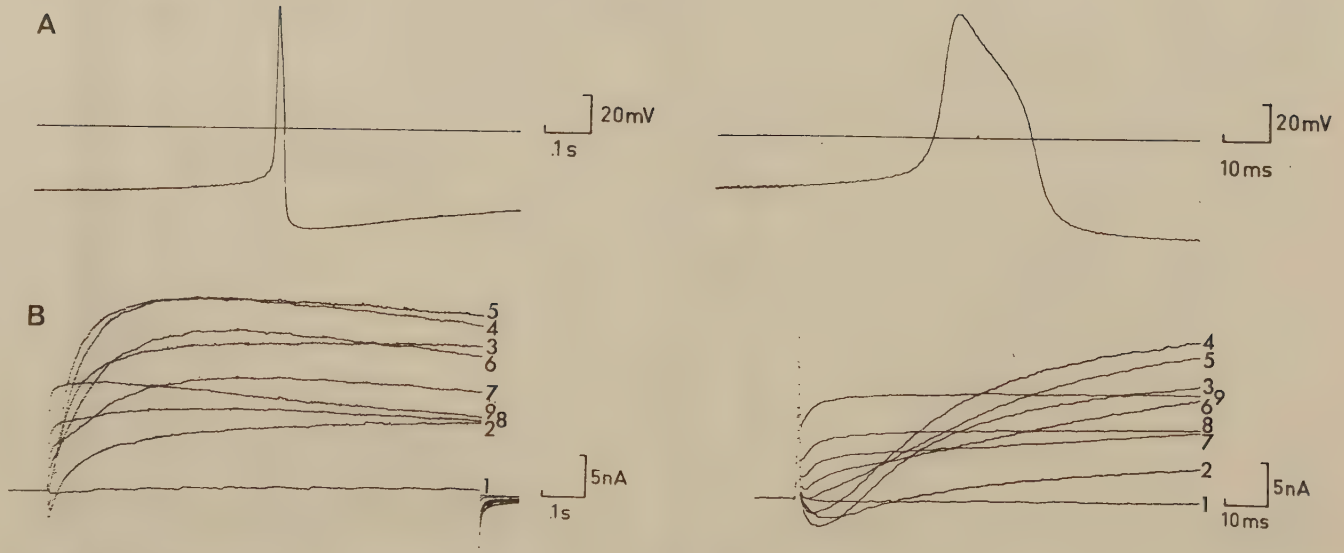


Abb.4.1.4 Aktionspotential (A) und Clampströme (B) einer Zelle des C-Typs, rechts jeweils mit größerer Zeitauflösung. Depolarisation in B in der Reihenfolge 1 - 9 von -5 bis +155 mV in Schritten von 20 mV ansteigend; Haltepotential -45 mV.

aktivierung auffällig. Isochrone Strom-Spannungskurven einer solchen Membran (Abb. 4.1.2) sind immer monoton, unabhängig davon, zu welchem Zeitpunkt nach Pulsbeginn der Strom gemessen wird. Im oberen Teil sind sie weitgehend linear. Dies bedeutet, daß die Membran dort eine gleichbleibende maximale Konduktivität besitzt und die Anstiegssteilheit als Maß für die Aktivierung des Systems angesehen werden kann. Abb. 4.1.3 zeigt die durch Auftragen der bei äquidistanten Potentialerhöhungen sich ergebenden Stromdifferenzen erhaltene Aktivierungskurve, die den klassischen Kurven von Hodgkin und Huxley (1952) weitgehend ähnelt. Sie zeigt eine halbmaximale Aktivierung bei etwa 0 mV. Die Einwärtsstromkomponente dieser Membranen ist im Allgemeinen sehr klein, ihre Aktivität ist entweder durch erregende postsynaptische Potentiale ausgelöst, oder die Zellen sind überhaupt nicht aktiv. Durch depolarisierende Strompulse können jedoch immer Aktionspotentiale ausgelöst werden. Diese haben aber einen vergleichsweise geringen Overshoot und eine geringe Dauer (Abb. 4.1.1A). Am anderen Ende der Skala stehen die Membranen des C-Typs. Erwartungsgemäß wachsen auch hier die Auswärtsströme mit steigender Depolarisation zunächst an. Oberhalb eines Potentials von etwa +50 mV, manchmal auch schon darunter, wird der zeitliche Stromanstieg jedoch langsamer und führt bei noch höheren Depolarisationen schließlich zu einem drastischen Rückgang des Auswärtsstroms. Erst bei noch höheren Potentialen steigt der Strom dann weiter an, wobei an den auf den Zeitpunkt t = 0 extrapolierten Strömen zu erkennen ist, daß man dabei bereits im Gebiet der eingangs erwähnten nur teilweise reversiblen Durchbrüche arbeitet. Meist wurden die Membranen dieser Klasse nur bis etwa 20 mV über das Potential des minimalen Auswärtsstroms depolarisiert.

Isochrone Strom-Spannungs-Kennlinien (Abb. 4.1.5) dieser Membranen zeigen einen ausgeprägten N-förmigen Verlauf, wobei die Lage von Minimum und Maximum auf der Potentialachse zusätzlich vom Zeitpunkt der Strommessung abhängig ist. Verglichen mit den Membranen des P-Typs ist die wesentlich langsamere Anstiegskinetik sowie das Fehlen jeglicher Inaktivierung bei depolarisierenden Pulsen von 1 s Dauer auffällig (Abb. 4.1.4.B). Auch fehlt die Beschleunigung des Stromanstiegs mit höheren Depolarisationen, im Gegenteil, der rampenartige Anstieg des Stroms bei hohen Potentialen zeigt eine gerade umgekehrte Potentialabhängigkeit der Anstiegskinetik. Bei weiterer Verlängerung der Clamp-Pulse wurde ein Maximum des Auswärts-Stroms oft erst nach mehreren Sekunden erreicht.

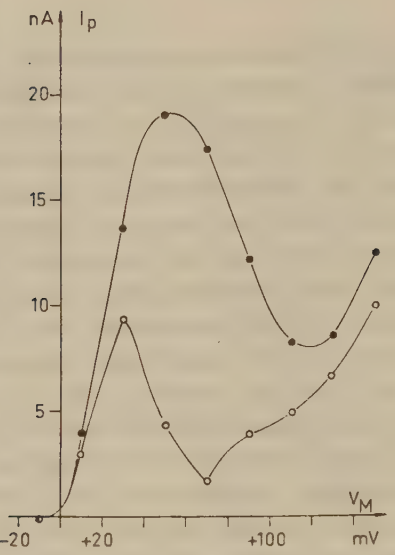


Abb. 4.1.5 I-V-Kurven einer Zelle des C-Typs. Ströme zu den Zeiten der entsprechenden Maxima von Abb. 4.1.1 (o) bzw. nach 100 ms (●) gemessen.

Bei kleinen Depolarisationen zeigen diese Zellen entweder einen stets weiter langsam ansteigenden Auswärtsstrom oder eine Sättigung. Bei höheren Depolarisationen jenseits des Maximums der Strom-Spannungs-Kurve wird eine langsame Inaktivierung beobachtet, die jedoch keinem exponentiellen Abfall entspricht (Abb. 4.1.6). Depolarisationen im Bereich der Erregungsschwelle zeigen den zuerst an der Bursterzelle beobachteten persistierenden Einwärtsstrom (Eckert und Lux 1976) in besonders starker Ausprägung. Diese Strom-Komponente erscheint in einem Potentialbereich von etwa -25 mV bis -15 mV als Netto-Einstrom, der auch im Laufe von 10 s dauernden Pulsen nicht inaktiviert (Abb. 4.1.7). Dieser Netto-Einstrom entwickelt sich auch bei entsprechenden Repolarisationen nach höheren Clamp-Pulsen, die einen Netto-Auswärtsstrom bewirken.
Auffällig an diesen Membranen ist auch der extrem hohe Wert des transienten Einwärtsstroms bei mäßigen Depolarisationen. Die Zellen zeigten immer eine regelmäßige Schrittmacher-Aktivität, d.h. die beobachteten Aktionspotentiale waren nicht synaptisch ausgelöst, sondern entstanden spontan.

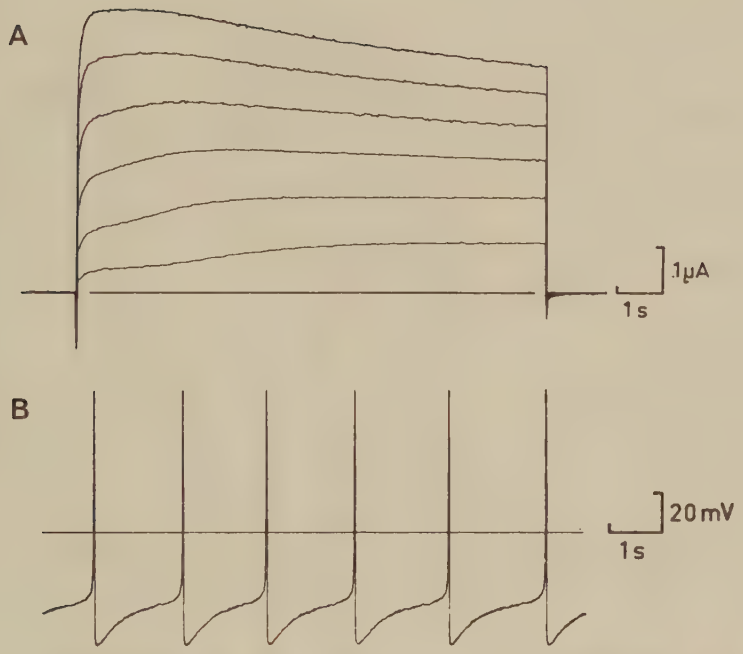


Abb. 4.1.6 Langzeitverhalten bei Zellen des C-Typs. A: Clamp-Ströme bei Depolarisationen von 10 s Dauer, Potential von 0 bis 50 mV in Schritten von 10 mV ansteigend. B: Regelmäßige Spontanaktivität.

Diese Aktionspotentiale haben stets einen extrem hohen Overshoot von meist über +70 mV und eine ungewöhnlich lange Dauer von 20 - 50 ms. Auffällig an der Form der Aktionspotentiale dieser Zellen ist dabei die sog. "Schulter", d.h. die deutlich sichtbare Verzögerung in der repolarisierenden Phase. Sie ähneln damit den späten Aktionspotentialen in einem Burst der Bursterzelle.
Weitaus am häufigsten angetroffen wurden jedoch Membranen des M-Typs, die eine Zwischenstellung zwischen den vorher beschriebenen Typen einnehmen. Während bei mittleren Depolarisationen auf etwa 0 mV in den Auswärtsströmen der Membranen aller drei Typen keine besonders offensichtlichen Unterschiede zu bemerken sind, zeigen die Membranen des M-Typs bei höheren Depolarisationen ein sehr komplexes Verhalten. Der primäre Anstieg des Auswärtsstroms wird mit steigender Depolarisation ebenso schneller, wie dies an den Membranen des P-Typs zu beobachten ist. Es fehlt jedoch die ausgeprägte Inaktivierung nach Oberschreiten des Maximums. Dagegen findet man

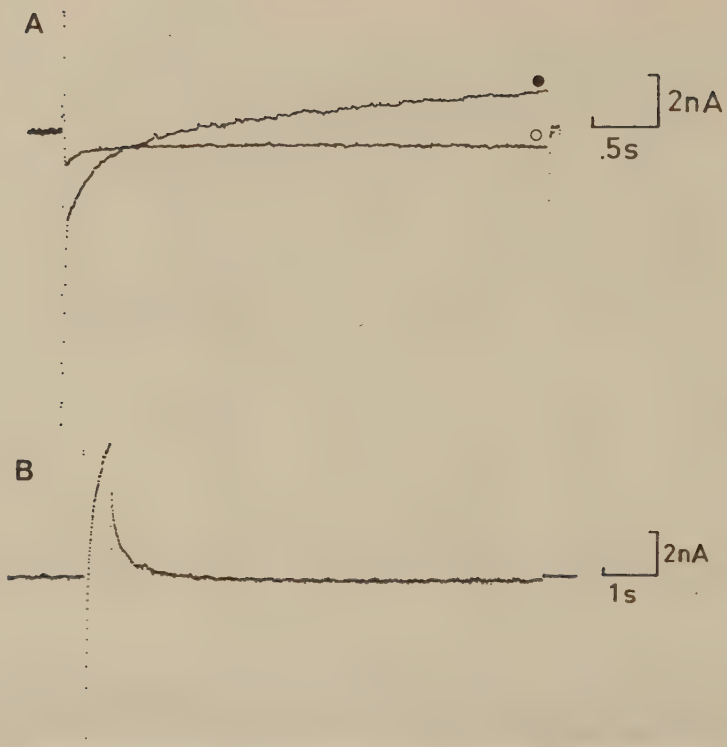


Abb. 4.1.7 Persistierender Einwärtsstrom im Bereich der Erregungsschwelle bei Zellen des C-Typs. A: Depolarisationen auf -28 mV (o) bzw. -18 mV (●).B: Entwicklung von persistierendem Einwärtsstrom bei Repolarisation auf -25 mV nach einer 500 ms dauernden Depolarisation auf -10 mV, die Netto-Auswärtsstrom induziert.

entweder ein monotones weiteres langsames Anwachsen des Stroms mit einem Maximum nach etwa 100 - 300 ms, oder bei noch höheren Pulsen einen nahezu flachen Verlauf. Verschiedene Beispiele des Stromverlaufs dieser Zellen bei hohen Depolarisationen zeigt Abb. 4.1.9. Die isochrone Strom-Spannungs-Kurve ist bei Messung innerhalb der ersten 10 ms ($T = 20^{o}C$) ebenso monoton wie bei den Membranen des P-Typs, bei späterer Messung geht sie jedoch in den N-förmigen Verlauf der Membranen des C-Typs über (Abb. 4.1.10). Der transiente Einwärtsstrom dieser Membranen ist von Fall zu Fall sehr verschieden, ebenso die Spontanaktivität der Zellen. Bei Zellen,

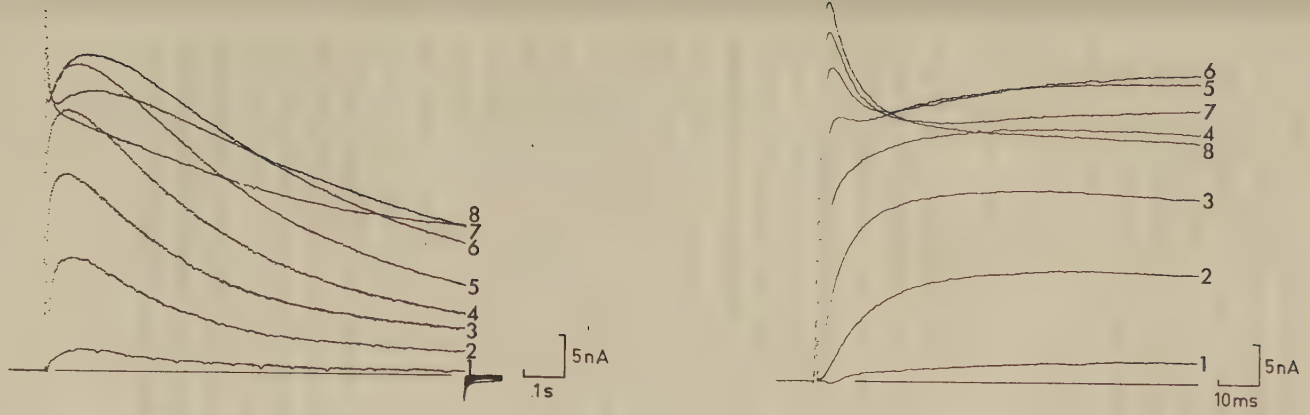


Abb. 4.1.8 Clampströme einer Zelle des M-Typs, rechts mit größerer Zeitauflösung. Depolarisationen in der angegebenen Reihenfolge von +10 bis +150 mV in Schritten von 20 mV steigend.

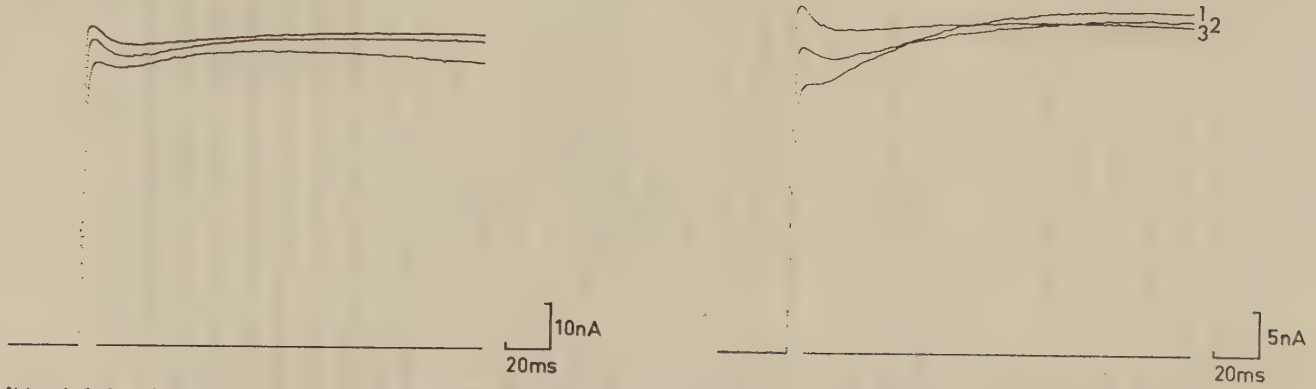


Abb. 4.1.9 Weitere Beispiele für Clampströme von Zellen des M-Typs bei höheren Depolarisationen auf +110, +130 und +150 mV.

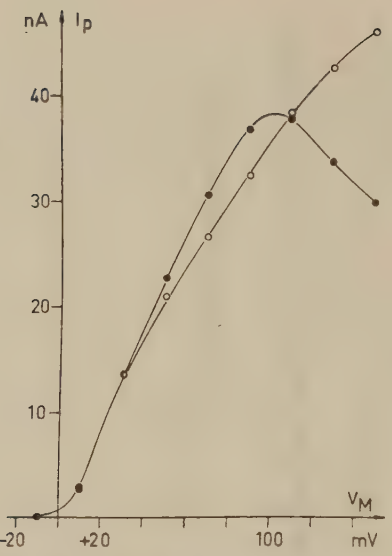


Abb. 4.1.10 I-V-Kurven einer Zelle des M-Typs. Ströme zu den Zeiten der entsprechenden Maxima von Abb. 4.1.1 (o) bzw. nach 100 ms (●) gemessen.

die aufgrund eines hohen Ruhepotentials inaktiv waren, konnten durch depolarisierende Strompulse in allen Fällen Aktionspotentiale mit mittlerem Overshoot ausgelöst werden. Es ist für die Aktionspotentiale dieser Zellen charakteristisch, daß sie sich im Laufe eines Trains immer mehr verbreitern, so daß sie schließlich mehr an die der Zellen mit Membranen des C-Typs erinnern, insbesondere durch Ausprägung der schon erwähnten "Schulter".

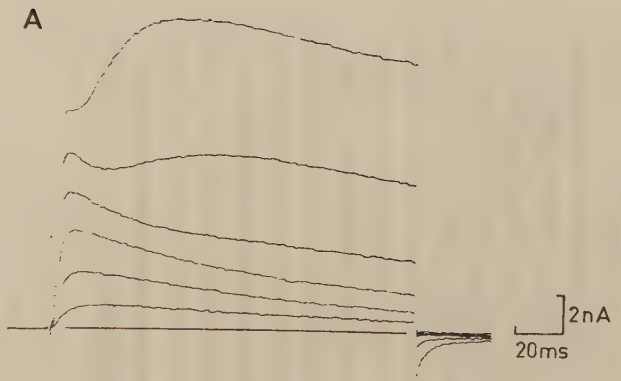
Vorkommen der einzelnen Typen

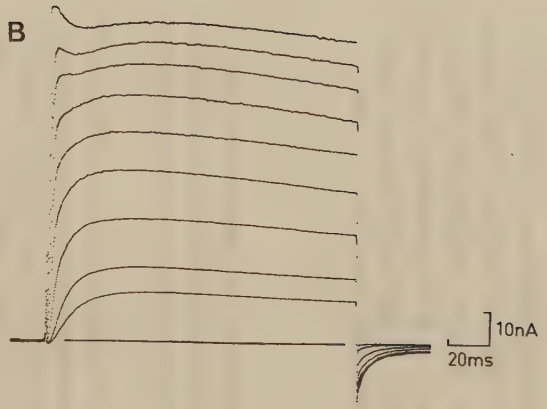
Da es das vornehmliche Ziel der Untersuchung war, Eigenschaften und Mechanismen der Membran-Konduktivitäten aufzuklären, nicht jedoch deren Funktion in den Ganglien der Schnecke, wurden keine systematischen Erhebungen über Vorkommen und relative Häufigkeiten der eben beschriebenen Typen gemacht.
Genauer lokalisierbar sind nur die Zellen des C-Typs. Sie finden sich nahezu ausschließlich in dem von Sakharov und Salanki (1969) als D-Gruppe bezeichneten Zellverband im rechten Parietalganglion, vereinzelt jedoch auch in anderen Teilen.

Die Zellen der D-Gruppe sind vergleichsweise klein (80 - 100 µm Ø), was insbesondere die Injektion in diese Zellen erschwert.
Ihr Ruhemembranwiderstand ist mit etwa 50 MOhm extrem hoch.Zellen des P-Typs fanden sich vor allem sowohl im dorsalen wie auch im ventralen Teil des linken Parietalganglions, sie umfaßten auch Riesenzellen mit 200 µm Ø. Die Mehrzahl der größeren Zellen in den Ganglien der Schnecke scheint jedoch zum M-Typ zu gehören, vor allem fast alle Riesenzellen im rechten Parietalganglion, darunter auch die sog. Bursterzelle (Sakharov und Salanki 1969, Salanki und Vadasz 1974, Heyer und Lux 1976).

Unterschwelliger Strom

Die stark unterschiedliche Kinetik der Auswärtsströme bei den geschilderten Zelltypen legt die Existenz zumindest zweier voneinander klar unterscheidbarer Auswärts-Strom-Systeme nahe, die entweder allein oder auch gemeinsam, mit unterschiedlichem Anteil am Gesamtstrom, auftreten können.
Bereits 1971 wurde von Connor und Stevens sowie von Neher und Lux eine vorerst nicht bekannte Komponente des Auswärtsstroms von Nervensomamembranen bei Schneckenzellen beschrieben. Es handelt sich dabei um den sog. unterschwelligen Strom, der bereits bei Potentialen unterhalb der Erregungsschwelle einschaltet, andererseits bei Ruhe- bzw. Haltepotentialen von -50 mV oder weniger gänzlich inaktiviert ist.
Es ist leicht nachzuweisen, daß es sich bei den im vorhergegangenen beschriebenen um zusätzliche Stromkomponenten handeln muß, d.h. daß die Zellsomamembranen insgesamt sogar mindestens bis zu drei verschiedene Stromsysteme enthalten können.
Abb. 4.1.11.A zeigt die Ströme einer Zelle des Typs M. Sie wurden von einem Haltepotential von -60 mV ausgehend aufgenommen, der auftretende Auswärtsstrom ist bis zu Potentialen von -10 mV ausschließlich unterschwelliger Strom, darüber schaltet dann auch der verzögerte Strom ein. Depolarisiert man die gleiche Zelle von einem Potential von -50 mV aus, so ist der unterschwellige Strom offensichtlich inaktiviert, und man erhält nur die verzögerte Komponente. Dennoch ist bei höheren Depolarisationen wieder die Aufspaltung in eine langsame und eine schnelle Komponente zu beobachten. Abb. 4.1.11.C zeigt eine andere Zelle, depolarisiert von einem Haltepotential von -60 mV, die das gleichzeitige Auftreten der drei verschiedenen Stromsysteme unmittelbar zeigt.
In den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden fast ausschließlich Haltepotentiale von -50 mV oder weniger verwendet, bei denen der unterschwellige Strom





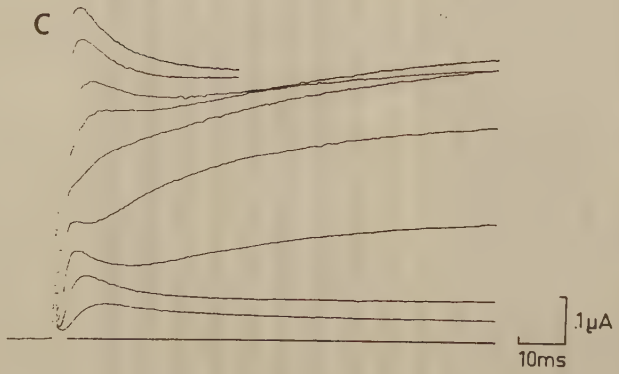


Abb. 4.1.11.A: Depolarisationen auf -30 bis +20 mV in Schritten von 10 mV steigend; Haltepotential -60 mV. B: Die gleiche Zelle depolarisiert auf +20, +30 und dann bis +170 mV in Schritten von 20 mV steigend; Haltepotential -50 mV. C: Gleichzeitiges Auftreten von drei Auswärts-Strom-Komponenten mit unterschiedlichen Kinetiken bei Depolarisationen auf -40 bis +120 mV in Schritten von 20 mV, Haltepotential -50 mV, jedoch mit einem hyperpolarisierenden Vorpuls auf -100 mV/500 ms.

vollständig inaktiviert ist (Connor und Stevens 1971, Neher und Lux 1971). Er wird daher bei den weiteren Untersuchungen nicht gesondert berücksichtigt, obwohl dieses System potentiell bei der Mehrzahl der untersuchten Zellen durchaus vorhanden war. Dies gilt vor allem für die kleineren Zellen der Typen P und C, weniger für die Riesenzellen (Neher und Lux 1971).

4.2. Zweifache Depolarisationen

Zur weiteren Untersuchung der potentialabhängigen Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der Membranen wurden verschiedene Experimente mit Doppelpulsen durchgeführt. Gemessen wird dabei der Stromverlauf bei einem festen Testpuls in Abhängigkeit von Höhe oder Dauer eines konditionierenden Vorpulses oder auch von der Länge einer Pause am Ruhepotential zwischen Vorpuls und Testpuls. Messungen dieser Art wurden ebenso wie an Axonen (Hodgkin und Huxley 1952) auch an Somamembranen bereits mehrfach durchgeführt (Neher und Lux 1971, Neher 1971, Connor und Stevens 1971). Während die Zahlenwerte der sich dabei ergebenden Daten für Schwellenpotentiale und Zeitkonstanten je nach dem jeweils untersuchten Präparat sehr unterschiedlich sind, haben doch alle diese Systeme eine grundlegende qualitative Eigenschaft gemeinsam: Eine Erhöhung des Ruhepotentials vor dem Testpuls, d.h. also ein hyperpolarisierender Vorpuls, erhöht in allen Fällen die Amplitude des beim Testpuls fließenden Stroms, während ein depolarisierender Vorpuls den Strom beim Testpuls stets verkleinert. Weiter bewirkt eine zeitliche Verlängerung des Vorpulses stets eine Verstärkung seiner Wirkung, während im Laufe einer Pause zwischen Vorpuls und Testpuls (bei der das Membranpotential auf dem Ruhewert gehalten wird) die Wirkung des Vorpulses im Allgemeinen wieder abklingt.

Einzige und wichtige Ausnahme von der zuletzt erwähnten Regel ist das von Neher und Lux (1971) gefundene und inzwischen weiter untersuchte (Gola 1974, Heyer und Lux 1976b) anomale Verhalten der im Voltage-Clamp gemessenen Auswärts-Ströme bei Nervensomamembranen, das auch einer der Ausgangspunkte für die vorliegende Untersuchung war.
Innerhalb eines gewissen Bereichs der Pausendauer findet man nämlich, daß der durch einen depolarisierenden Vorpuls verkleinerte Auswärtsstrom beim darauffolgenden Testpuls nicht durch Zwischenschalten der Pause in Abhängigkeit von deren Länge monoton wieder auf den Ausgangswert ansteigt, sondern bis zu Pausenlängen von etwa einer Sekunde zunächst weiter absinkt, und erst für noch größere Pausen dann schließlich wieder den Ausgangswert erreicht. Wie im folgenden gezeigt wird, unter-

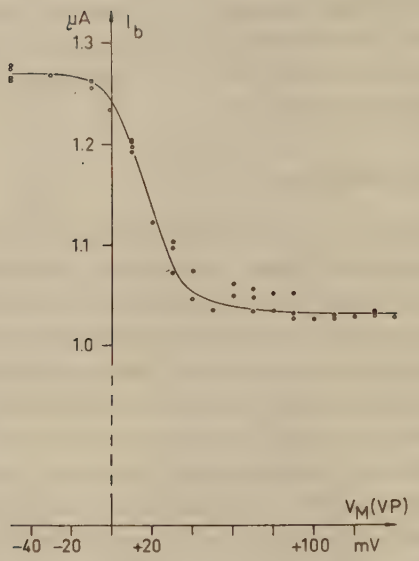


Abb.4.2.1 Inaktivierung des Auswärtsstroms einer Zelle des P-Typs in Abhängigkeit von der Amplitude eines 10 ms-Vorpulses. Test-Depolarisation auf +50 mV, maximale Ströme.

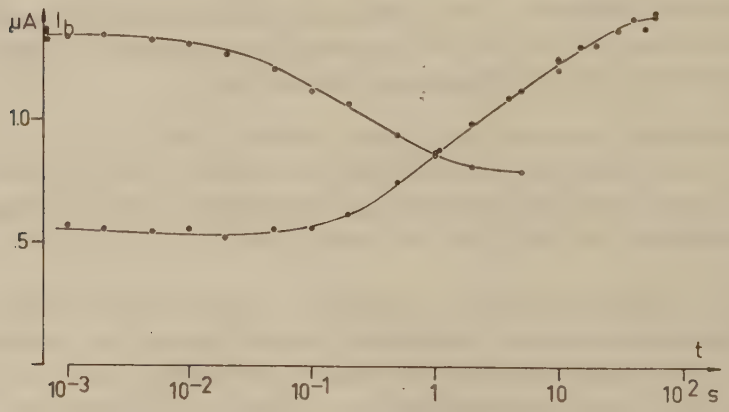


Abb. 4.2.2 (o) Inaktivierung des Auswärtsstroms einer Zelle des P-Typs in Abhängigkeit von der Dauer eines Vorpulses auf +50 mV. (●) Rückkehr der Aktivierbarkeit in Abhängigkeit von der Dauer einer Pause am Ruhepotential nach vorheriger Inaktivierung durch einen Vorpuls von 1 s Dauer auf +50 mV. Test-Depolarisationen auf +50 mV, maximale Ströme.

scheiden sich die Zellen der in 4.1. eingeführten drei Typen signifikant bezüglich dieser Depression (Lux und Eckert 1974, Heyer und Lux 1976b) des Auswärtsstroms.

Als Beispiel einer sich völlig im klassischen Sinn verhaltenden Stromkomponente wurden die Membranströme der Zellen des P-Typs gefunden. Abb. 4.2.1 und 4.2.2 zeigen die Abhängigkeit der Inaktivierung von der Amplitude und der Dauer eines Vorpulses, sowie der Rückkehr der Aktivierbarkeit von der Pausenlänge. Weitere Messungen zur Reaktivierung dieser Komponente wurden gemacht, um Aufschluß darüber zu erhalten, in welchem Abstand aufeinanderfolgende Messungen durchgeführt werden dürfen, ohne daß sie sich gegenseitig beeinflussen. Neben einer Reaktivierungszeitkonstante in der Größenordnung von 5 - 20 s fiel auf, daß eine weitere wesentlich längere zusätzlich vorhanden sein muß. Selbst bei Pausen von 30 s zwischen zwei aufeinanderfolgenden Depolarisationen auf +30 mV für 150 ms war das Maximum beim zweiten Puls kleiner als das des ersten, vor dem eine Pause von mehreren Minuten lag (Abb. 4.2.3).

Wird der Grad der Inaktivierung durch einen Faktor $k \leq 1$ ausgedrückt, und sei I_{max} der maximal erreichbare Strom ohne jede Inaktivierung, also nach einer beliebig langen Pause am Ruhepotential, so erhält man k in Funktion von der Pausendauer t_p aus $k(t_p) = \frac{I(t_p)}{I_{max}}$. Bei Annahme eines exponentiellen Abklingens der Inaktivierung mit der Zeitkonstante τ_R gilt

$$1 - k(t_p) = (1-k_o)e^{-t/\tau R}$$

Durch Auftragen von $\ln(1-k(t_p))$ gegen t_p ergab sich für τ_R bei mehreren Messungen ein Bereich von 20 - 60 s. Abb. 4.2.4 zeigt das Beispiel einer solchen Messung. Bei allen weiteren Messungen wurden daher zwischen den einzelnen Pulsen Pausen von mindestens 30 s eingehalten.

Diese Stromkomponente verhält sich also im klassischen Sinne, analog zu den von Hodgkin und Huxley (1952) untersuchten Strömen am Tintenfisch-Axon, wobei die festgestellte extrem langsame Reaktivierung eine Besonderheit darstellt, die bei allen Messungen zu berücksichtigen ist.

Ein von diesem völlig abweichendes Bild zeigen dagegen die Membranen des C-Typs. Unter 4.1. wurde bereits die anomale Abhängigkeit von Stromgröße und Anstiegskinetik vom Potential bei diesen Zellen beschrieben. Eine weitere Neuerung bringt die Reaktion dieser Zellen auf depolarisierende Vorpulse, speziell bei Verwendung sehr

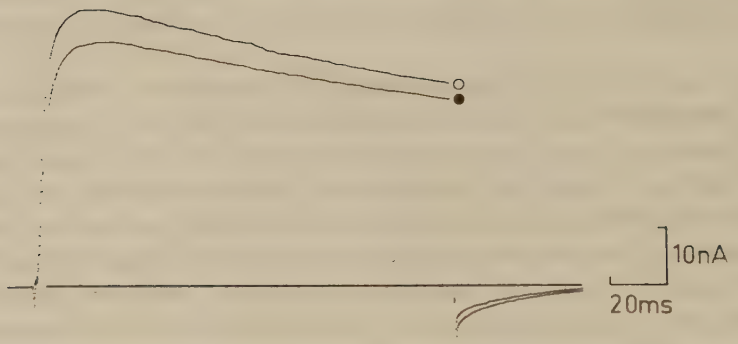


Abb.4.2.3 Clampströme einer Zelle des P-Typs bei Depolarisationen auf +30 mV im Abstand von 30 s (●) bzw. nach 5 min.

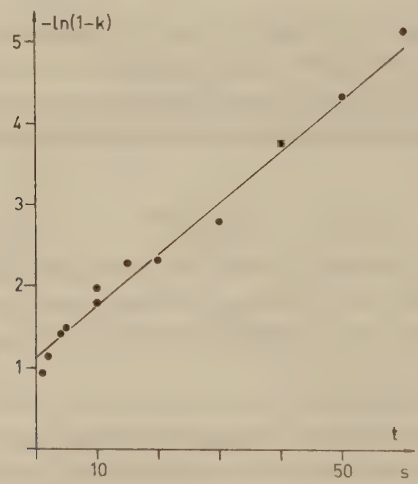


Abb. 4.2.4 Halblogarithmisches Diagramm zur Ermittlung der Reaktivierungskonstanten, siehe Text.

hoher Depolarisationen als Testpulse.
Da die Ströme dieser Membranen kaum oder garnicht inaktivieren, bringt ein depolarisierender Vorpuls auch keine Veränderung des Gleichgewichtswerts des Auswärtsstroms bei mäßigen Testdepolarisationen mit sich (Abb. 4.2.5.A). Vermindert ist allerdings der transiente Einwärtsstrom, dies in völliger Obereinstimmung mit dem klassischen Modell. Effektiv ergibt sich dadurch ein beschleunigtes Einschalten des Netto-Auswärts-Stroms. Hyperpolarisierende Vorpulse haben keinerlei spezifische Effekte auf diese Stromkomponente, es tritt dann jedoch, wie bereits unter 4.1 beschrieben, die unterschwellige Stromkomponente in Erscheinung.
Eine besonders auffällige Wirkung von depolarisierenden Vorpulsen war immer ab solchen Test-Depolarisationen zu beobachten, bei denen der Stromanstieg verlangsamt war. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Ladungstransportsystemen in erregbaren Membranen bewirkten dann depolarisierende Vorpulse keine Verkleinerung, sondern eine häufig sehr drastische Vergrößerung der Auswärtsströme. Abb. 4.2.5.B zeigt diesen Effekt für eine Depolarisation auf +110 mV bei der gleichen Zelle, deren Auswärtsstrom bei einer Testdepolarisation auf +30 mV nach einem ebensolchen Vorpuls praktisch nicht verändert wurde. Die ohne Vorpuls N-förmige Strom-Spannungs-Kennlinie wird durch den depolarisierenden Vorpuls monoton und teilweise sogar linear (Abb. 4.2.6). Diese mit dem Vorpuls verbundene Konduktivität ist jedoch nicht etwa schon am Ende des Vorpulses vorhanden, sondern es ist offensichtlich, daß sich durch den Vorpuls der Strom zum Zeitpunkt des Einsatzes des Testpulses praktisch noch nicht geändert hat. Dennoch erreicht er nach 100 ms bereits den dreifachen Wert wie ohne Vorpuls. Es handelt sich also nicht um eine während dem Vorpuls entstandene Konduktivität, sondern dieser Vorpuls konditioniert die Membran so, daß sie bei der darauffolgenden höheren Depolarisation die Konduktivität entwickeln kann. Offensichtlich ist auch, daß mit erhöhter Depolarisation keine Beschleunigung des Stromanstiegs, wie etwa bei den Membranen des P-Typs, verbunden ist. Das Ausmaß dieser Konditionierung ist sowohl von der Höhe wie auch von der Dauer des Vorpulses abhängig. Die zeitliche Abhängigkeit ist eine monotone Funktion der Dauer des Vorpulses, die für Vorpulse in der Größenordnung von Sekunden in Sättigung übergeht (Abb. 4.2.7). Auffällig ist, daß für längere Vorpulse zwar das Maximum des Auswärtsstroms nicht weiter ansteigt, dafür jedoch der Abfall des Stromes während 1 s dauernden Testdepolarisation geringer wird, d.h. die Wirkung des Vorpulses hält länger an. Der Anstieg der Wirkung sehr kurzer Vorpulse ist deutlich sigmoid (Abb. 4.2.8).

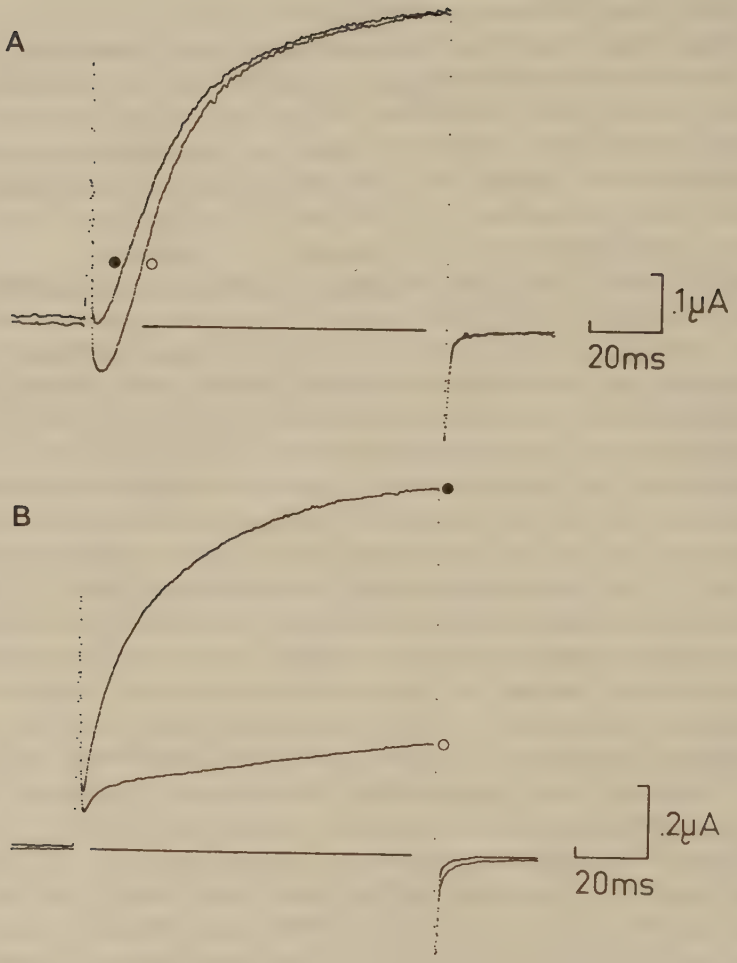


Abb. 4.2.5 Clampströme einer Zelle des C-Typs bei Depolarisationen auf +30 mV (A) bzw. +110 mV (B). Mit (●) gekennzeichnete Ströme nach einem Vorpuls auf -10 mV/100 ms.

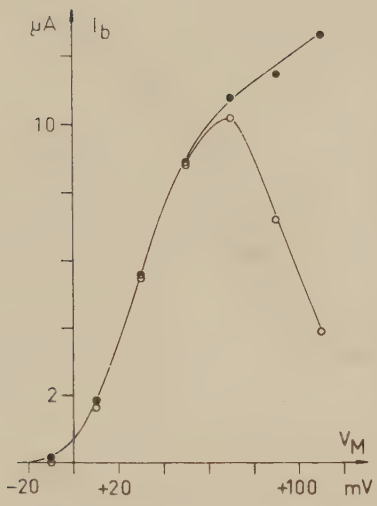


Abb. 4.2.6 Isochrone I-V-Kurve einer Zelle des C-Typs, (o) ohne Vorpuls, (●) mit Vorpuls auf -10 mV für 500 ms.

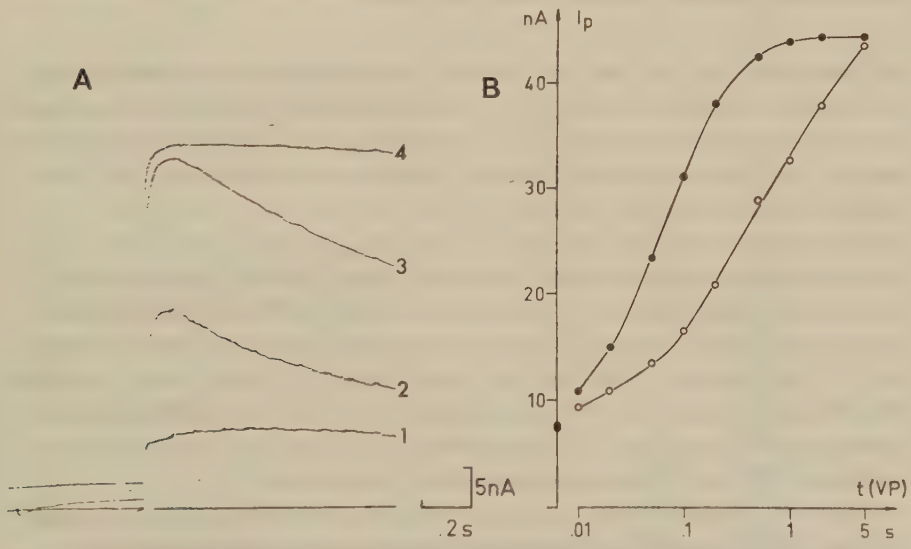


Abb. 4.2.7 Auswärtsströme einer Zelle des C-Typs bei Depolarisationen auf +130 mV nach Vorpulsen variabler Dauer auf 0 mV. A: Dauer der Vorpulse 0 ms (1), 50 ms (2), 500 ms (3), 5 s (4). B: Isochrone Ströme nach 100 ms (●) bzw. nach 1 s (o).

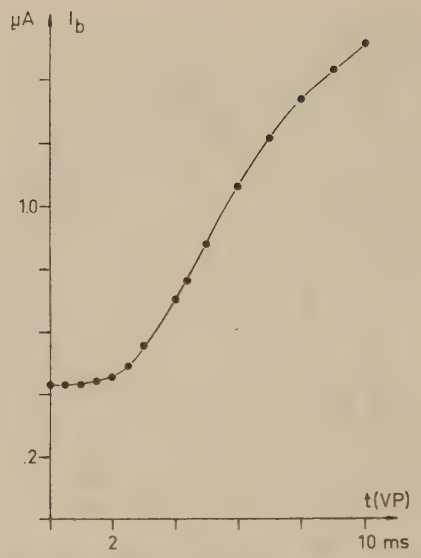


Abb. 4.2.8 Isochrone (t_M = 100 ms) Auswärtsströme bei einer Depolarisation auf +150 mV nach Vorpulsen Variabler Dauer auf +20 mV.

Die Abhängigkeit von der Höhe des Vorpulses zeigt ein Maximum bei Membranpotentialen von +30 - +50 mV (Abb. 4.2.9). Noch höhere Vorpulse haben wieder geringere Wirkung, wie ja auch zu erwarten ist, da bei einem "Vorpuls" von der gleichen Höhe wie der Testpuls nur eine zeitliche Verschiebung des Pulses auf der Zeitachse vorgenommen wird (Abb. 4.2.10).
Während den üblichen Pausen von 30 s zwischen den einzelnen Clamp-Pulsen klingt die Wirkung kurzer depolarisierender Vorpulse jeweils wieder völlig ab (Abb. 4.2.11). Verkürzt man die Pausendauer weiter, so ergibt sich aber keine einheitliche Abkling-Zeitkonstante, vielmehr ist diese auch von der Länge des Vorpulses abhängig. Abb. 4.2.12.A zeigt das Verhalten nach einem Vorpuls von 500 ms Dauer, nach dem die Wirkung erst nach 5 s völlig abgeklungen ist. Dagegen ist nach dem in 4.2.12.B gezeigten Vorpuls von nur 20 ms Dauer schon zwischen den im Abstand von 500 ms aufeinanderfolgenden Pulsen kein Unterschied mehr zu sehen.
Eine ähnliche Wirkung wie depolarisierende Vorpulse im Voltage-Clamp können auch im Current-Clamp ausgelöste Aktionspotentiale als sozusagen "physiologische" Vorpulse haben.

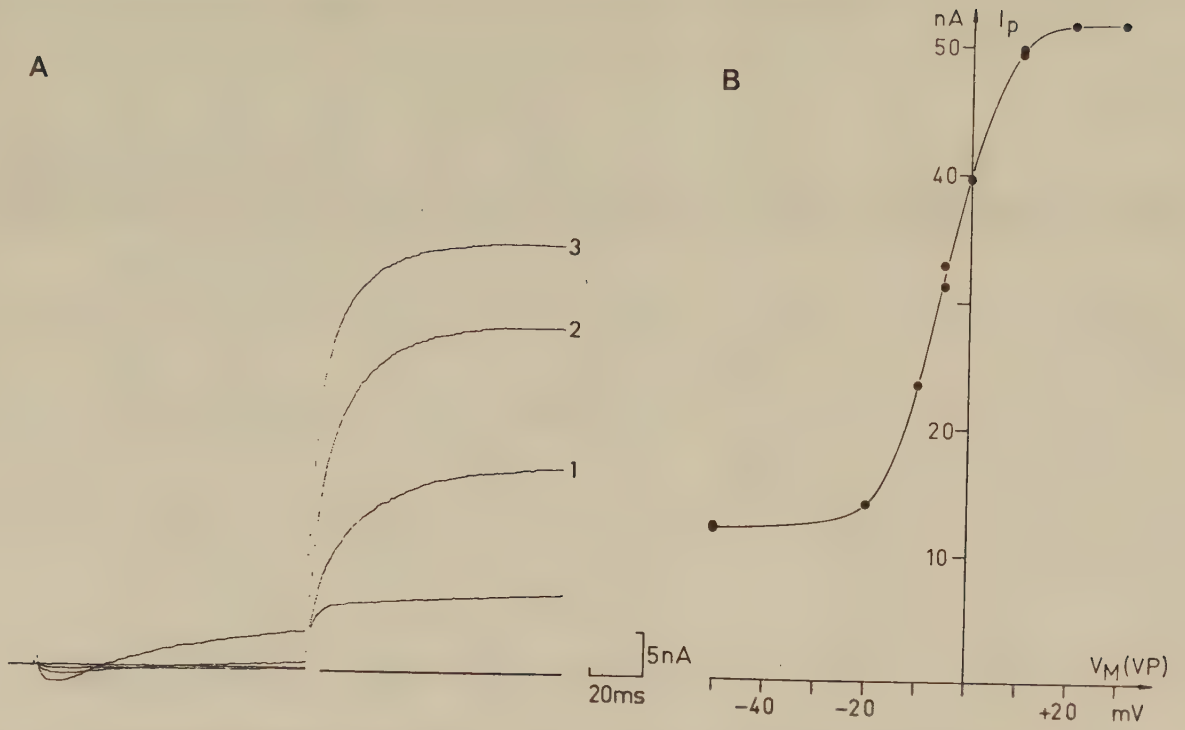


Abb. 4.2.9 Auswärtsströme von Zellen des C-Typs bei Depolarisationen auf +130 mV nach Vorpulsen variabler Amplitude. A: Vorpuls auf -10 (1), 0 (2), +10 (3) mv bzw. ohne Vorpuls. B: Dauer der Vorpulse 100 ms, isochrone Ströme (t_M = 100 ms).

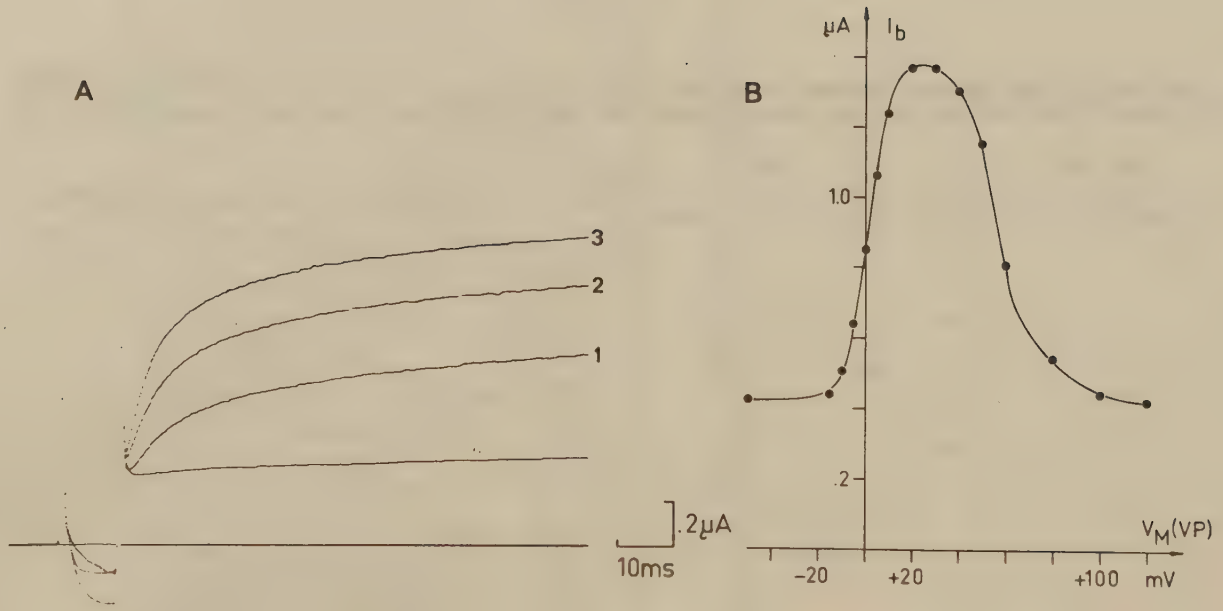


Abb. 4.2.10 Auswärtsströme von Zellen des C-Typs bei Depolarisationen auf +150 mV nach Vorpulsen variabler Amplitude. A: Vorpuls auf 0 (1), +20 (2), +50 mv (3) bzw. ohne Vorpuls. B: Dauer der Vorpulse 10 ms, isochrone Ströme (t_M = 100 ms).

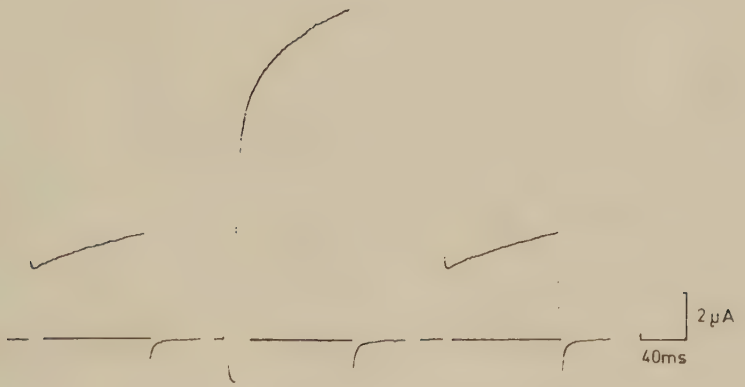


Abb. 4.2.11 Clampströme bei Depolarisationen einer Zelle des C-Typs auf +150 mV im Abstand von jeweils 10 s; Vorpuls auf +20 mV.

Abb. 4.2.13 zeigt den Auswärtsstrom bei der direkten Depolarisation, nachdem die Membran längere Zeit bei -50 mV Haltepotential im Voltage-Clamp gehalten wurde. Der aktivierte Strom ist dabei praktisch Null. Dann wurde für 20 s in Current-Clamp umgeschaltet und durch Einstellung eines konstanten Stromes die Auslösung von 20 Aktionspotentialen bewirkt. Von Hand wurde daraufhin in Voltage-Clamp zurückgeschaltet und unmittelbar darauf ein weiterer Testpuls ausgelöst, der nach den vorangegangenen Aktionspotentialen jetzt einen drastisch vergrößerten Stromfluß zur Folge hat. Während nun die Membran weiter im Voltage-Clamp bei -50 mV Haltepotential verblieb, wurden im Abstand von jeweils weiteren 10 s die nächsten Testpulse ausgelöst. Auch 40 s nach dem letzten Aktionspotential ist deutlich noch die Wirkung des tetanischen Reizes zu sehen.
Abb. 4.2.14 zeigt noch einmal das unterschiedliche Zeitverhalten nach Konditionierung durch beide Methoden bei der gleichen Zelle. Maximale Wirkung wird durch gleichzeitige Anwendung beider Methoden erzielt (Abb. 4.2.15), wobei das Abklingverhalten dem der Konditionierung durch Aktionspotentiale entspricht. Schließlich zeigt Abb. 4.2.16, daß auch ein Vorpuls in der Abklingphase zwar eine volle momentane Wirkung hat, die Auswärtsströme nach 10 bzw. 20 s aber schon nicht mehr beeinflußt.

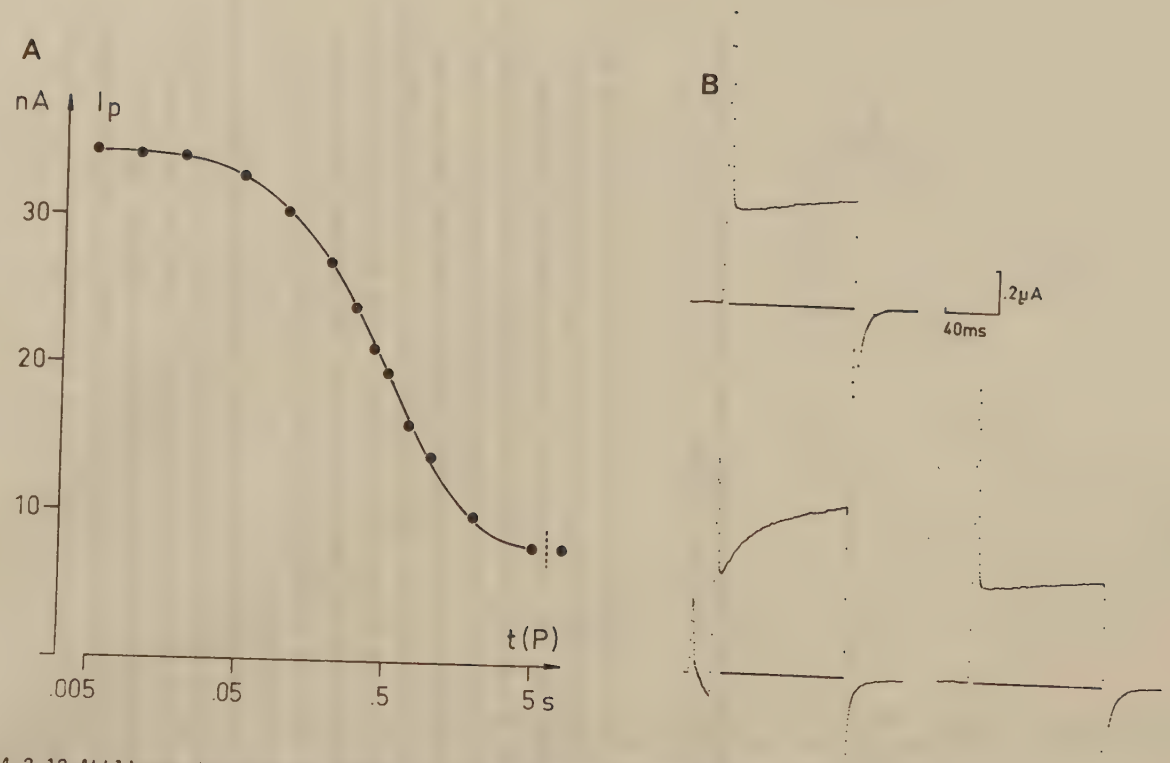


Abb. 4.2.12 Abklingen der Wirkung depolarisierender Vorpulse während einer Pause am Ruhepotential.
A: Maximale Auswärtsströme bei einer Depolarisation auf +135 mV nach einem Vorpuls auf -5 mV/5oo ms.
B: Clampströme in jeweils 5oo ms Abstand bei einer Depolarisation auf +17o mV, mit einem Vorpuls auf +1o mV.

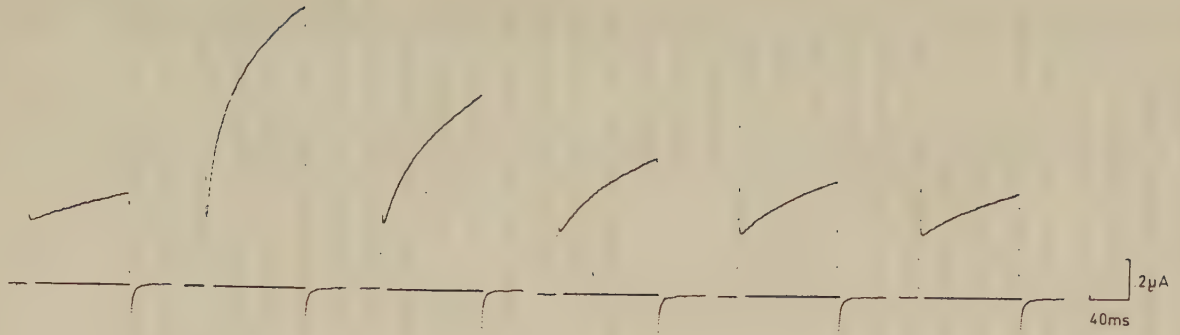


Abb. 4.2.13 Clampströme bei Depolarisationen einer Zelle des C-Typs auf +15o mV in Abständen von 1o s. Zwischen Kontrolle und nächstem Puls wurden in der Stromklemme in 2o s zwanzig Aktionspotentiale ausgelöst.

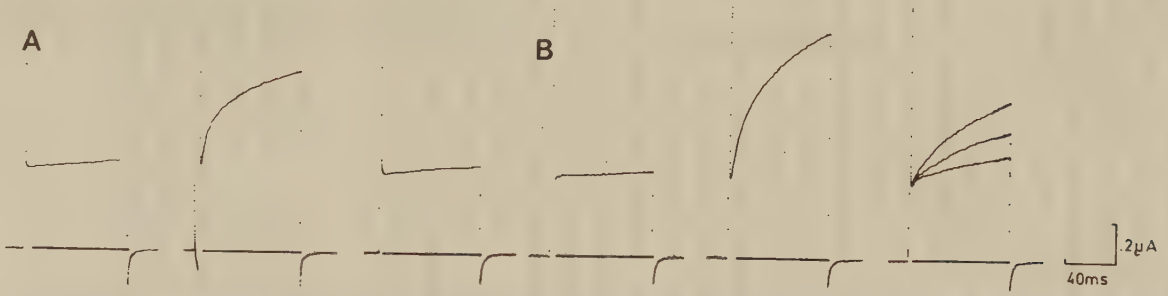


Abb. 4.2.14 Clampströme bei Depolarisationen einer Zelle des C-Typs auf +17o mV. A: Zweiter Puls mit Vorpuls auf +1o mV, Pausendauer 1o s. B: Vor zweitem Puls 43 Aktionspotentiale in 3o s, danach Pausendauer jeweils 1o s.

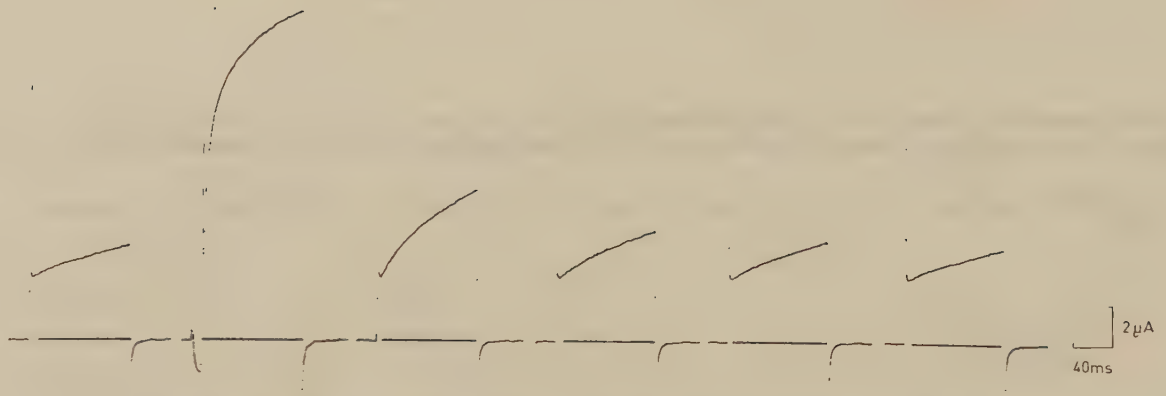


Abb.4.2.15 Gleichzeitige Konditionierung durch ca. zwanzig Aktionspotentiale in 2o s und durch Vorpuls auf +2o mV; Pausendauer 1o s, Testdepolarisationen +15o mV.

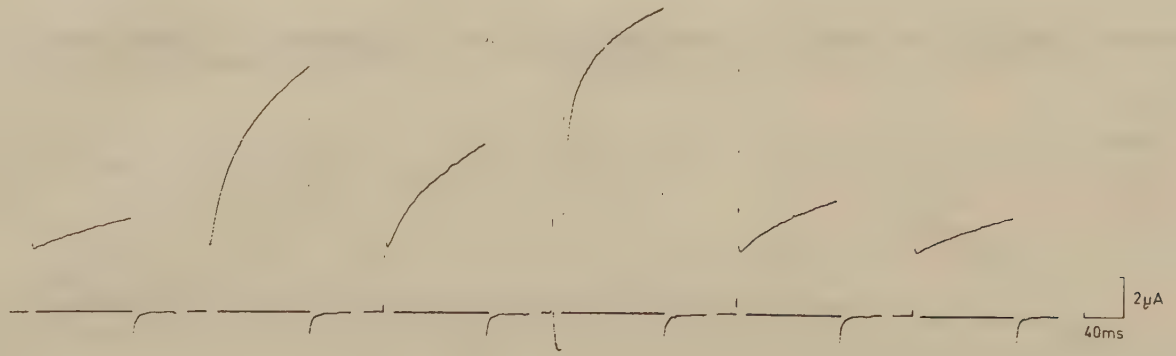


Abb. 4.2.16 Konditionierung durch Vorpuls auf +2o mV während der Abklingphase einer Konditionierung durch Aktionspotentiale. Pausendauer 1o s, Testdepolarisationen +15o mV.

Nach diesen Ergebnissen und unter Berücksichtigung der bereits in 4.1. geäußerten Vermutung, die Membranen des M-Typs als einen Mischtyp aus den Typen P und C anzusehen, wurden gleiche Untersuchungen auch an einer Anzahl von Zellen dieses Typs vorgenommen. Analog zu den bereits geschilderten Resultaten ist durch depolarisierende Vorpulse ebenfalls eine teilweise sehr deutliche spezifische Erhöhung der späten Komponente des Auswärtsstroms zu erzielen. Da durch diese Vorpulse die schnelle Stromkomponente u.U. bereits merklich geschwächt wird, ist im Stromverlauf nach einem solchen Vorpuls die unmittelbare Unterscheidung beider Komponenten nicht mehr möglich.
Abb. 4.2.17 zeigt typisches Verhalten dieser Zellen bei hyperpolarisierenden und depolarisierenden Vorpulsen. Die extrem starke Erhöhung der schnellen Auswärtsstromspitze bei dem Vorpuls auf -90 mV läßt auf die Aktivierung der unterschwelligen Stromkomponente schließen (Connor und Stevens 1971, Neher und Lux 1971). Die stark nichtlinearen bzw. N-förmigen Strom-Spannungs-Charakteristiken dieser Zellen werden durch depolarisierende Vorpulse weitgehend linearisiert.
Es wurden nun analoge Untersuchungen bezüglich Höhe und Dauer der Vorpulse sowie der Wirkung von Pausen zwischen Vorpuls und Testpuls wie bei den Membranen vom Typ C vorgenommen. Ein qualitativ neues Verhalten ergab sich bei der Variation der Dauer dieser Vorpulse. Bei allen Zellen, deren Stromtrajektorien bei hohen Depolarisationen eine schnelle und eine langsame Komponente erkennen ließen, war durch die Wahl der Vorpulsparameter sowohl eine Fazilitierung wie auch eine Depression des Auswärtsstroms zu erzielen. Bei den in Abb. 4.2.18 gezeigten Testdepolarisationen auf +150 mV wird die langsame Komponente des Auswärtsstroms durch Vorpulse von etwa 50 ms Dauer auf +20 mV maximal konditioniert. Aus dem Inaktivierungsverlauf nach den 1 s langen Vorpulsen geht hervor, daß die Verkleinerung des Stroms nicht allein auf die nur potentialabhängige, schnelle Komponente zurückzuführen ist, sondern speziell nach den kleineren Vorpulsen auf 0 mV die weitere Verlängerung des Vorpulses offenbar zur völligen Nicht-Aktivierbarkeit der langsamen Komponente führt.
Für solche lange, ausschließlich depressiv wirkende Vorpulse wurde deren Wirkung in Abhängigkeit von ihrer Höhe genauer ausgemessen. Wie Abb. 4.2.19 zeigt, setzt die Depression der langsamen Komponente deutlich schon bei kleineren Vordepolarisationen ein. Andererseits ist die Wirkung solcher kleinen Vorpulse gleichgültig welcher Länge ausschließlich depressiv, und nur Vorpulse ab einer gewissen Höhe sowie der richtigen Länge führen zu einer Stromerhöhung beim Testpuls.

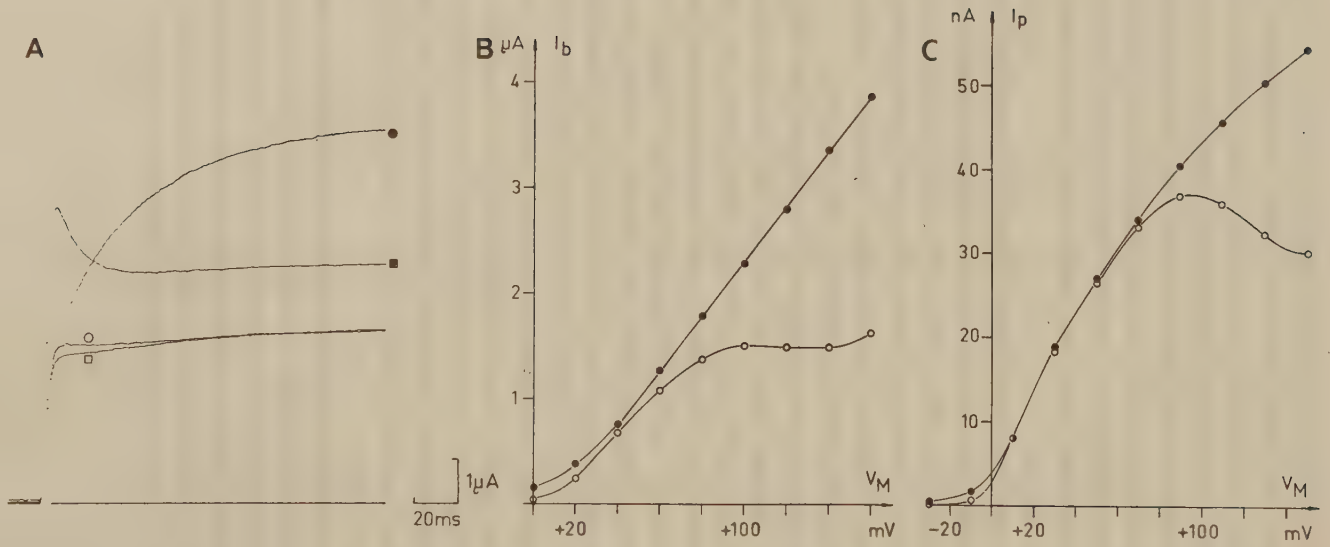


Abb. 4.2.17 Clampströme von Zellen des M-Typs nach Vorpulsen. A: Testdepolarisation +13o mV, Vorpuls -9o mV (■), -7o mV (○), -3o mV (●), ohne Vorpuls (□); Dauer der Vorpulse 5oo ms. B: Isochrone (t=5o ms) I-V-Kurven ohne Vorpuls (○) bzw. nach Vorpuls auf +4o mV für 4o ms. C: Wie B, Vorpuls jedoch auf o mV für 4o ms.

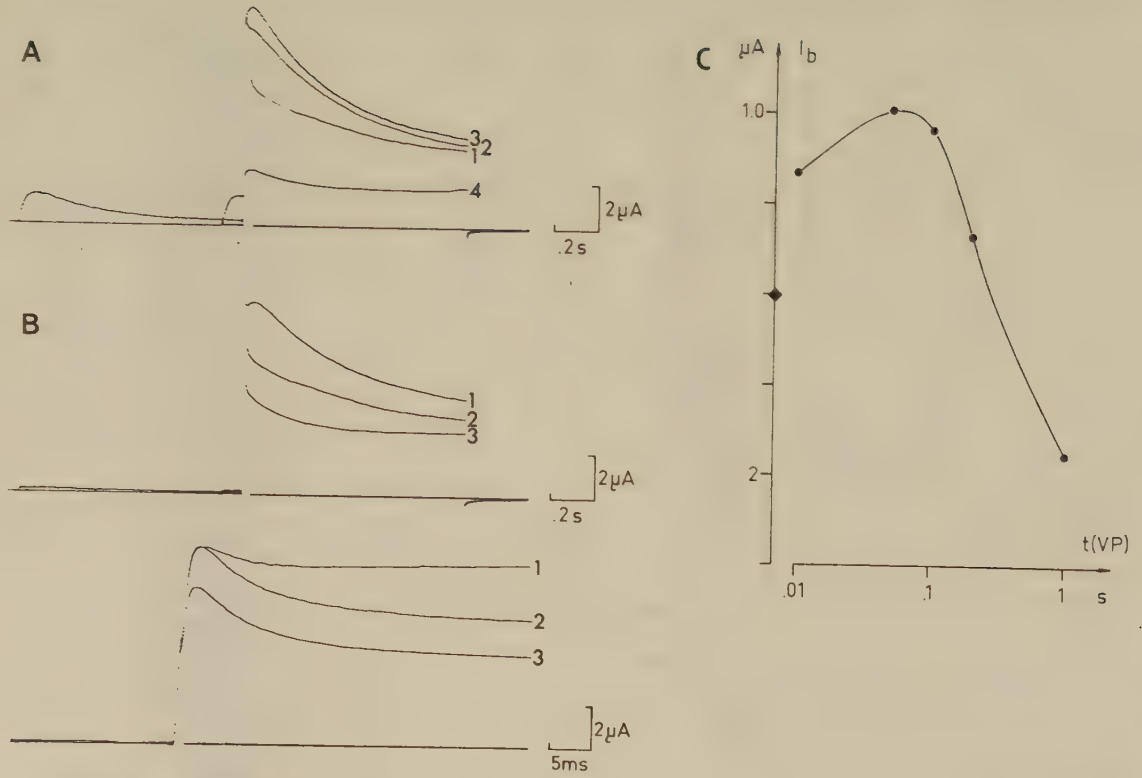


Abb. 4.2.18 Bimodale Reaktion der Clampströme von Zellen des Typs M auf Vorpulse unterschiedlicher Dauer und Amplitude bei Testdepolarisationen auf +15o mV. A: Variation der Dauer von Vorpulsen auf +2o mV: ohne Vp (1), 1o ms (2), 1oo ms (3), 1 s (4). B: Variation der Dauer von Vorpulsen auf o mV: ohne Vp (1), 1oo ms (2), 1 s (3) (unten Anfangsphase in höherer zeitlicher Auflösung). C: Isochrone Strommessung nach 5o ms, Vp auf 2o ms, (◆) ohne Vp.

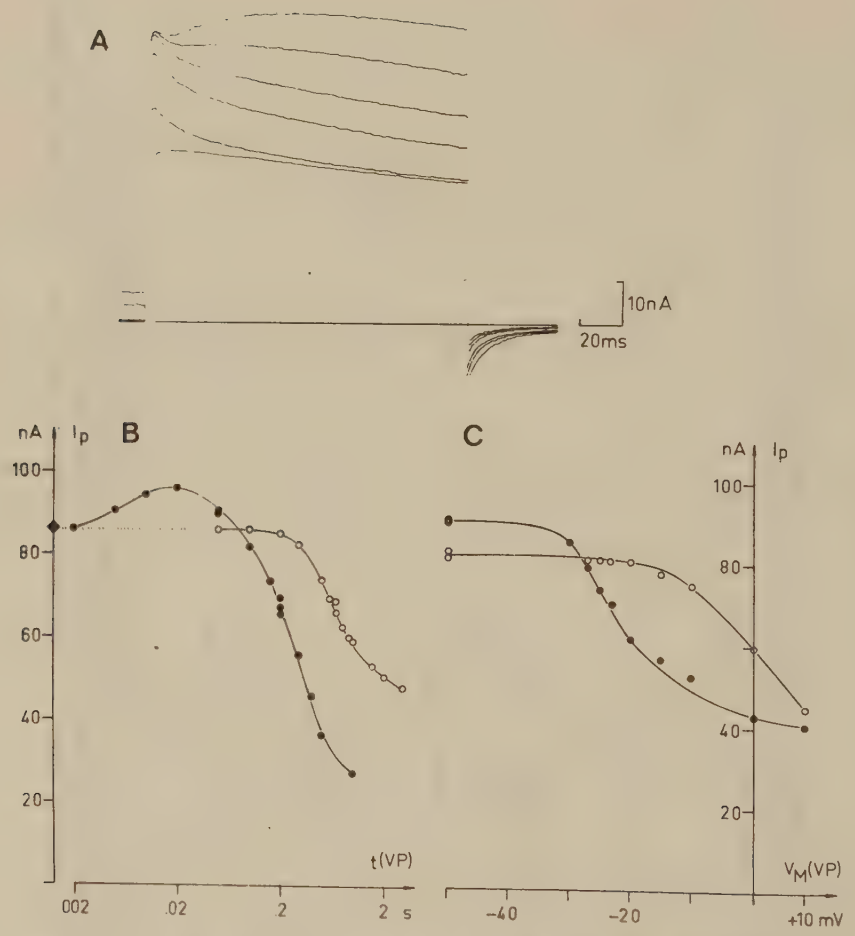


Abb. 4.2.19 Reaktion der Clampströme von Zellen des Typs M auf Vorpulse unterschiedlicher Dauer und Amplitude. A: Testdepolarisation +11o mV, Vorpulse -3o bis +1o mV in Schritten von 1o mV ansteigend mit monoton abnehmendem Strom beim Testpuls; Dauer der Vorpulse 5oo ms. B: nach 1oo ms einer Depolarisation auf +11o mV gemessene Clampströme nach Vorpulsen der angegebenen Dauer auf -25 mV (○) bzw. +5 mV. C: Clampströme nach 4 ms (○) bzw. 1oo ms (●) einer Depolarisation auf +11o mV nach Vorpulsen auf das angegebene Potentialund konstanter Dauer von 1oo ms.

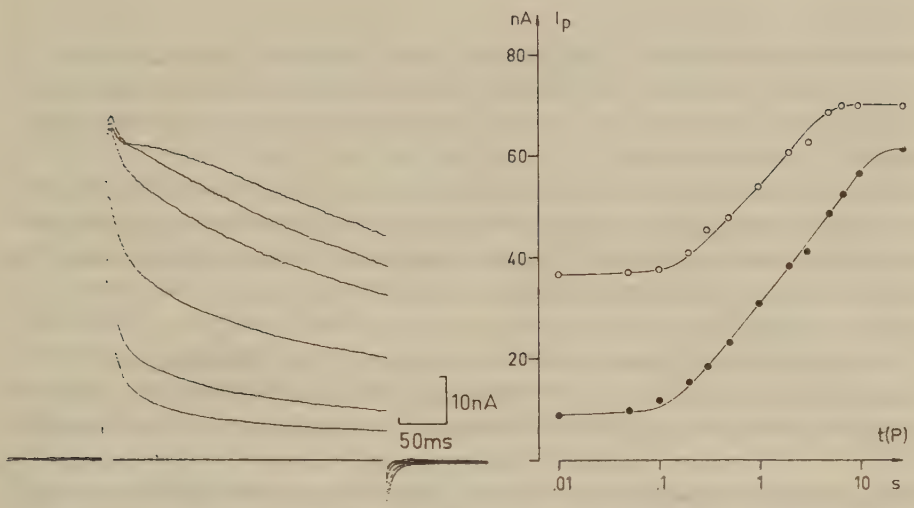


Abb. 4.2.2o Erholung der Clampströme von Zellen des M-Typs von der Depression durch Vorpulse; Testdepolarisation +11o mV, Vorpuls auf o mV für 5 s; isochrone Strommessung nach 4 ms (○) bzw. nach 1oo ms (●).

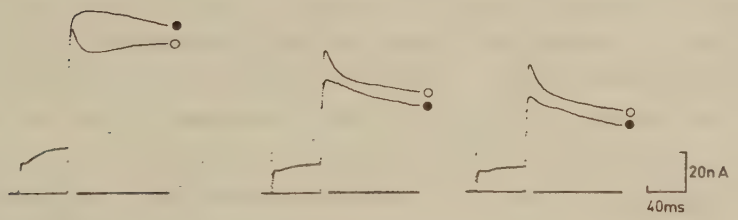


Abb. 4.2.21 Depression der Clampströme bei repetitiver Depolarisation jeweils ohne (○) und mit (●) Vorpuls auf +2o mV; Testdepolarisation +11o mV, Pausen zwischen den Pulsen 1 s; dargestellt sind die jeweils 1., 2. und 5. Pulse.

Schließlich wurde in Experimenten wie den in Abb. 4.2.20 gezeigten die Erholung der beiden Komponenten des Auswärtsstroms von der Depression durch einen sehr langen Vorpuls untersucht. Die Form der Stromtrajektorien zeigt unmittelbar, daß die schnellere Komponente des Auswärtsstroms auch die Depression schneller überwindet.

Ebenso wie die relativen Anteile der beiden Stromkomponenten am Gesamtstrom einer Klasse M-Membran von Zelle zu Zelle unterschiedlich sind, variieren auch Ausmaß und Zeitgang der beschriebenen Depression. Die Angabe allgemein gültiger Werte für die Aktivierungs- und Inaktivierungs-Parameter ist daher im Augenblick nicht möglich.

Abb. 4.2.21 schließlich zeigt, daß für die Entwicklung der Depression der Zeitfaktor wichtiger ist als die Depolarisation beim Vorpuls per se. Die Membran wurde hier repetitiv auf +100 mV depolarisiert, und zwar je in einer Serie mit und ohne Vorpulse. Es ist zu sehen, daß der Effekt der Vorpulse sich während der Pause zwischen der ersten und der zweiten Depolarisation umkehrt, in der das Potential der Membran wieder auf das Ruhepotential geklemmt wurde.

4.3. Momentane Messung differentieller Konduktivitäten

Bei der zuerst mit der Methode des Voltage-Clamp untersuchten Membran des Tintenfisch-Axons (Hodgkin und Huxley 1952) erwiesen sich die Membranströme bei plötzlichen Veränderungen des Membranpotentials als linear. Das momentane Potential tritt in den HH-Gleichungen daher als einfacher Faktor $(V_M - V_G)$ auf. Am später untersuchten Ranvier'schen Schnürring (Frankenhaeuser 1963) ließen sich die momentanen Ströme der Membran dagegen nicht als Produkt eines ohm'schen Leitwerts mit einer effektiven Potentialdifferenz beschreiben, sondern es mußte die nichtlineare Constant-Field-Gleichung (Goldman 1943) herangezogen werden. Unter bestimmten Bedingungen und teilweise in nicht-physiologischen Potentialbereichen wurden an beiden Präparaten später auch stückweise negative differentielle Konduktivitäten gefunden (Meissner 1965, L.E. Moore 1967, Bezanilla und Armstrong 1972).
Ähnliche anomale Konduktivitäten finden sich auch bei Membranen der Nervensomazellen von Helix pomatia, wenn in einer zweistufigen Depolarisation auf Potentiale jenseits des Maximums der N-förmigen isochronen Strom-Spannungs-Kennlinie geklemmt wird. Abb. 4.3.1 zeigt den Auswärtsstrom bei einer Grunddepolarisation auf +70 mV, der für 5 ms eine weitere Potentialänderung von + bzw. -60 mV überlagert ist, die Polarität der Zusatzpulse ist dabei an der Richtung der kapazitiven Artefakte erkennbar. In beiden Fällen wird der Auswärtsstrom der Membran kleiner, was im Falle des positiven Zusatzpulses einer negativen differentiellen Konduktivität entspricht. Diese Beobachtung wird in Kap. 4.8. genauer beschrieben, sie diente als Ausgangspunkt für die Untersuchung der momentanem Konduktivität speziell bei den Zellen des C-Typs in Abhängigkeit vom Membranpotential. Der gesuchte Differentialquotient $\frac{dI}{dV}$ wurde durch den Differenzenquotienten $\frac{\Delta I}{\Delta V}$ angenähert, indem der jeweiligen Testdepolarisation kurzzeitige Potentialänderungen von +20 bis +30 mV überlagert und die jeweiligen Stromdifferenzen unmittelbar nach dem Abklingen des kapazitiven Artefakts ausgewertet wurden.
In Abb. 4.3.2.A ist der typische Verlauf des Stromsprungs ΔI bei einer zusätzlichen Depolarisation von +30 mV gegen das Membranpotential aufgetragen, und zwar für Zusatzpulse bei 100 bzw. 900 ms nach Beginn der Grunddepolarisation. Bis zu solchen Potentialen, bei denen noch keine Verlangsamung der Anstiegskinetik des Membranstroms zu beobachten ist erreicht die differentielle Konduktivität, die den Aktivierungszustand der Membran widerspiegelt, ein Maximum. Darüber jedoch, dort wo die Strom-Spannungs-Kennlinie flacher wird und sich schließlich umkehrt, nimmt

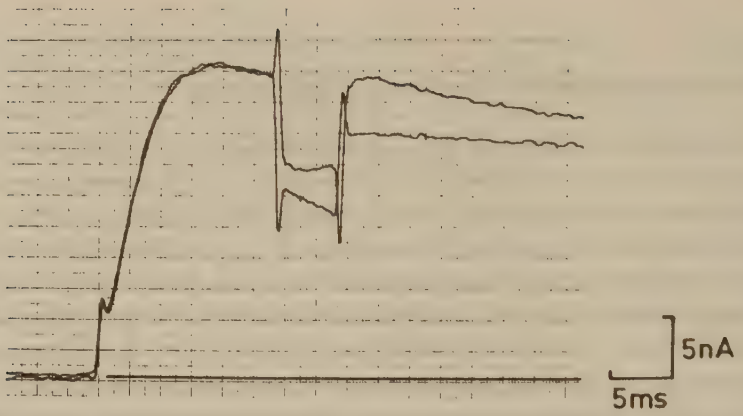


Abb. 4.3.1 Momentane Verminderung des Auswärtsstroms bei Überlagerung einer Depolarisation auf +7o mV mit einer Depolarisation um weitere +6o mV bzw. -6o mV.

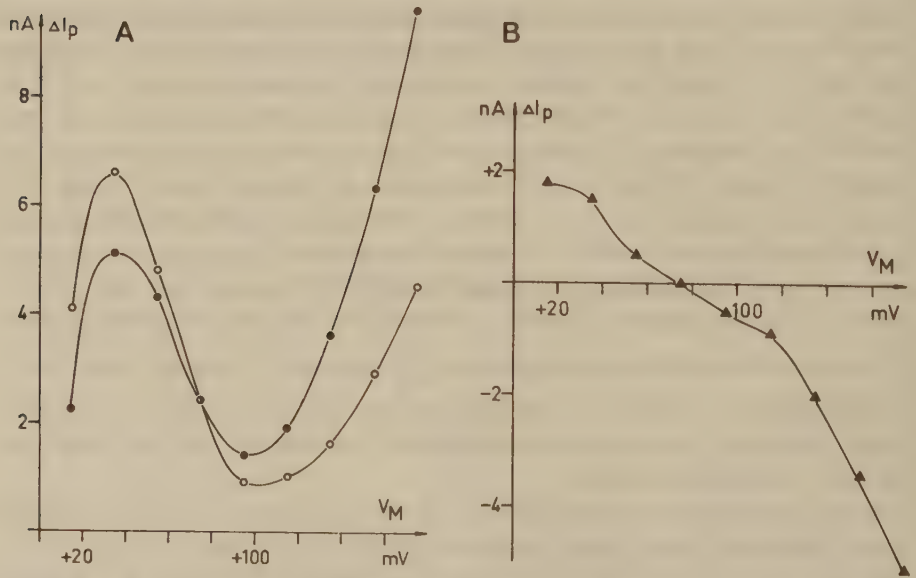


Abb. 4.3.2 A: Stromsprung ΔI bei einer zusätzlichen Depolarisation von +3o mV in Abhängigkeit von der Amplitude der Grunddepolarisation. (●) 1oo ms bzw. (○) 9oo ms nach Beginn der Grunddepolarisation. B: Differenz der Werte von A bei früher und später Messung.

sie wieder ab und steigt erst oberhalb von +100 mV wieder an.
Verfolgt man den Verlauf der Konduktivität während der eine Sekunde dauernden Depolarisation, ausgedrückt durch den Unterschied der Stromsprünge bei früher bzw. später Messung, so zeigt auch dieser eine eindeutige Potentialabhängigkeit. Bei niedrigen Potentialen steigt ΔI etwa im gleichen Maße wie auch der Auswärtsstrom, d.h. es findet eine sehr langsame weitere Entwicklung der Aktivierung statt. Bei Pulshöhen, bei denen sie am schnellsten vor sich geht (ca. +70 mV) und sehr bald ein Gleichgewicht des Auswärtsstroms erreicht wird, gilt das gleiche auch für die Konduktivität. Bei noch höheren Potentialen nimmt diese im Laufe der einen Sekunde sogar ab, obwohl der Strom in der bereits geschilderten Weise noch in allen Fällen zunimmt. Dies ist ein Hinweis darauf, daß der Leitungsmechanismus jenseits des Auswärtsstrom-Minimums ein anderer ist als bei niedrigen Potentialen.
Zur Feststellung einer eventuellen momentanen Gleichrichtung wurde der Quotient der Differenzströme bei positiven und negativen Potentialsprüngen untersucht (Abb. 4. 3.3). Im Zustand maximaler Aktivierung ist die Membran weitgehend linear, bei höheren Potentialen jenseits des Strommaximums der I-V-Kennlinie tritt jedoch eine zunehmend stärker ausgeprägte auswärtsgerichtete Gleichrichtung auf, die unabhängig vom Membrantyp ist. Es erscheint auch aus diesem Grunde offensichtlich, daß bei solchen hohen Depolarisationen ein neuer Konduktivitäts-Mechanismus in den Vordergrund tritt. Bei Depolarisationen im gleichen Potentialbereich fanden Heyer und Lux (1976) drastisch vergrößerte extrazelluläre K^+-Konzentrationen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß es sich um beginnnende Durchbruchserscheinungen handelt, die aber durchaus reproduzierbar und reversibel sind, solange Höhe und Dauer der Depolarisationen nicht übertrieben werden.
Der Verlauf der Auswärts-Gleichrichtung während einem 1 s-Puls ist abnehmend, d.h. der rampenartige Stromanstieg beruht nicht auf einer Zunahme dieses zusätzlichen Mechanismus, sondern ist eine extrem langsame weitere Aktivierung des bei niedrigen Potentialen vorherrschenden Systems.
Die besonders bei hohen Testpulsen zu beobachtende drastische Stromerhöhung durch kleine depolarisierende Vorpulse ließe erwarten, daß auch die differentielle Konduktivität durch diese Vorpulse im gleichen Maße vergrößert wird. Daß dies nicht der Fall sein muß zeigt Abb. 4.3.4, in der die Membranströme bei einer Testdepolarisation auf +130 mV mit zusätzlichen Potentialsprüngen von +20 mV durch Verschieben der jeweiligen Nullpunkte so dargestellt sind, daß die Stromspuren vor den Potentialsprüngen zusammenfallen. Im Gegensatz zu der Erhöhung der Auswärtsströme durch die Vorpulse finden wir hier eine Verminderung, ja Umkehrung der Stromdifferenzen.

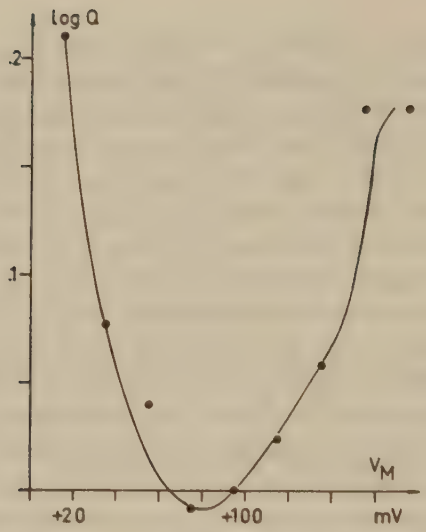


Abb. 4.3.3 Momentane Gleichrichtung der Ströme bei gleichgroßen positiven (Δ I+) und negativen (Δ I-) Potentialsprüngen, gemessen 2oo ms nach Beginn der Depolarisation. $Q = \left| \frac{\Delta I+}{\Delta I-} \right|$.

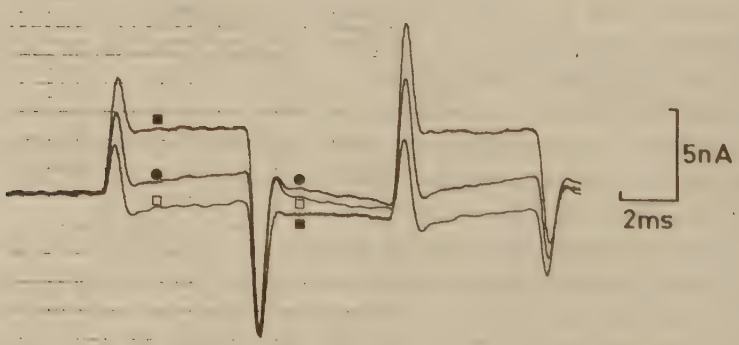


Abb. 4.3.4 Verhalten bei positiven und negativen Potentialsprüngen nach Konditionierung durch depolarisierende Vorpulse von 5oo ms Dauer. Depolarisationen +13o mV +/- 2o mV. Stromamplituden I_O vor den Potentialsprüngen durch Verschieben der Nullpunkte zur Deckung gebracht. (■) ohne Vorpuls, I_O=8.12 nA; (●) Vorpuls -5 mV, I_O=37.5 nA; (□) Vorpuls +3o mV, I_O= 5o.6 nA.

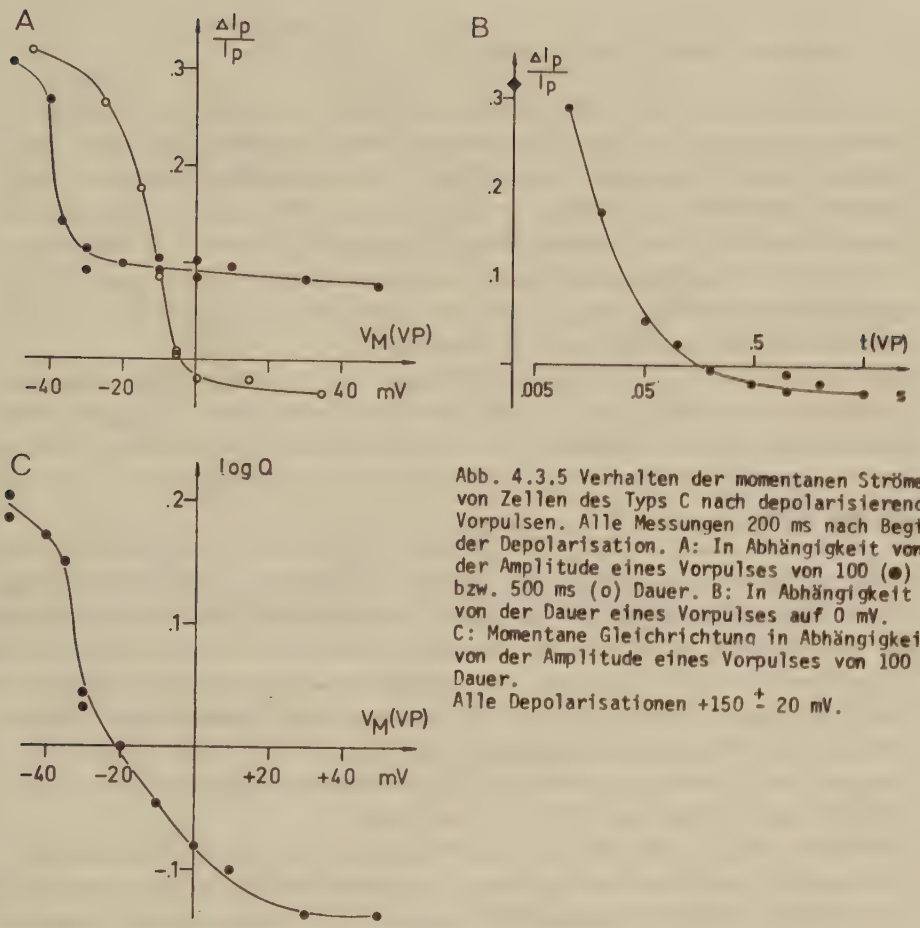


Abb. 4.3.5 Verhalten der momentanen Ströme von Zellen des Typs C nach depolarisierenden Vorpulsen. Alle Messungen 200 ms nach Beginn der Depolarisation. A: In Abhängigkeit von der Amplitude eines Vorpulses von 100 (●) bzw. 500 ms (o) Dauer. B: In Abhängigkeit von der Dauer eines Vorpulses auf 0 mV. C: Momentane Gleichrichtung in Abhängigkeit von der Amplitude eines Vorpulses von 100 ms Dauer.
Alle Depolarisationen +150 ± 20 mV.

Die in Abb. 4.3.5 gezeigten Messungen zeigen ein monotones Absinken des Quotienten $\Delta I/I$ in Abhängigkeit von Höhe und Länge des Vorpulses. Außerdem kehrt sich noch das Gleichrichtungsverhältnis nach solchen Vorpulses um (Abb. 4.3.5C). Die Diskrepanz zwischen der langsamen Stromentwicklung bei der einfachen, langdauernden Depolarisation und dem differentiellen Strom ist offensichtlich. Während im ersten Fall die sich ergebende Strom-Spannungs-Kurve bei geeigneter Wahl des Vorpulses regulär monoton und sogar weitgehend linear verläuft, ist dies für die kurzzeitigen Potentialveränderungen nicht der Fall.

4.4. Injektion komplexierender Substanzen

Aus der analytischen Chemie sind Substanzen bekannt, die speziell zweiwertige Kationen mit hohem Stabilitätskonstanten binden können. Es handelt sich dabei vor allem um die viel verwendeten Komplexbildner Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) sowie Bis-(aminoäthyl)-glycoläthertetraessigsäure (EGTA). Letzteres zeichnet sich vor allem durch eine hohe Selektivivität für Kalzium im Vergleich mit Magnesium aus. Das in der Füllösung der Stromelektrode verwendete Citrat-Ion zeigt ebenfalls ein beträchtliches Bindungsvermögen für Kalzium (Heinz 1951, Davies und Hoyle 1955), es wurde daher in die Untersuchungen mit einbezogen.
Die Komplexbildner wurden als wässrige Lösungen ihrer Di-Kalium-Salze in die untersuchten Zellen druckinjiziert, im Falle des Citrat wurde teilweise auch mit Iontophorese gearbeitet, um den Effekt des Citrat-Anions bei iontophoretischer Applikation von TEA unter Voltage-Clamp und Verwendung einer Kaliumcitrat-gefüllten Stromelektrode zu simulieren.
In erster Linie wurde Di-Kalium-EGTA injiziert, um die speziellen Effekte der Kalzium-Konzentration auf der Innenseite der Membran zu untersuchen, wobei Magnesium wegen der um einen Faktor von etwa 10^5 geringeren Stabilitätskonstante unbetroffen bleibt. Aus Untersuchungen an verschiedenen biologischen Membranen und künstlichen Phospholipid-Doppelschichten ist bekannt, daß Veränderung der Kalzium-Konzentration in der Badlösung durch Abschirmung negativer Festladungen an der Außenseite der Membran die Lage der Aktivierungs- und Inaktivierungskurven auf der Potentialachse verschieben kann (Gilbert und Ehrenstein 1969, Mozhayeva und Naumov 1970, Hille et al. 1975, Muller und Finkelstein 1972, D'Arrigo 1974).
Zur Untersuchung, ob die Wirkungen von EGTA intrazellulär mit einer solchen Veränderung des Oberflächenpotentials an der Innenseite der Membran durch Komplexierung dort gebundenen Kalziums zusammenhängen, wurden Aktivierungskurven des unterschwelligen Stromes (Neher 1971) in Abhängigkeit von Injektionen von EGTA aufgenommen. Abb. 4.4.1 zeigt das Ergebnis einer solchen Messung, bei der keine signifikante Verschiebung festzustellen ist. Als Mittelwert aus vier Experimenten ergab sich eine Verschiebung von +0.5 mV $\pm$ 1.4 mV des Potentials, bei dem der Strom zur Hälfte inaktiviert ist (b = 0.5). Veränderungen des Oberflächenpotentials können bei der Wirkung von EGTA also keine wesentliche Rolle spielen.
Da die Zellen des C-Typs aufgrund ihrer geringen Größe zur Injektion nicht geeignet sind, wurden nur Zellen des M-Typs injiziert. Bei diesem Zelltyp besteht die auffälligste Wirkung einer EGTA-Injektion in einer drastischen Verminderung des Netto-

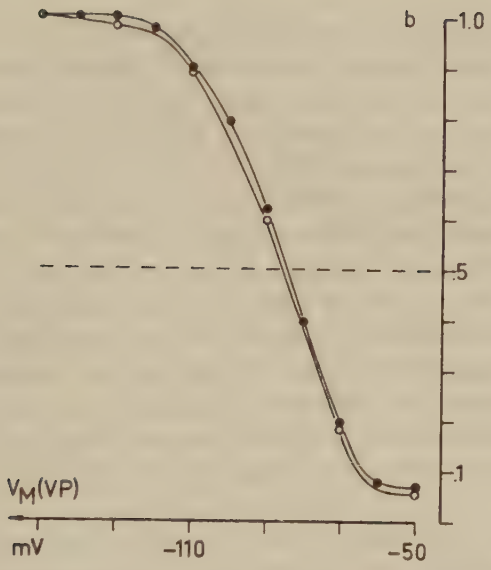


Abb. 4.4.1 Potentialabhängigkeit des Inaktivierungsparameters b des unterschwelligen Auswärtsstroms vor (●) bzw. nach (○) Injektion von EGTA.

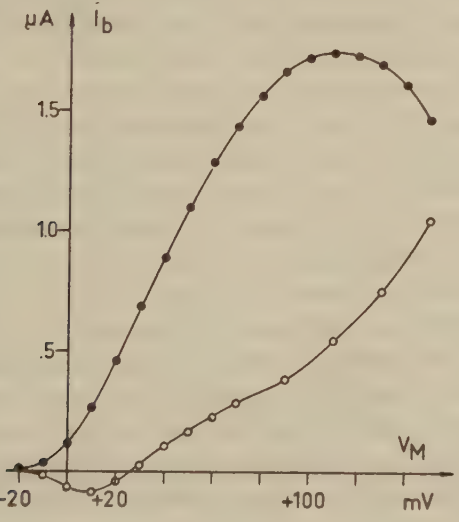


Abb. 4.4.2 Isochrone (t=100 ms) I-V-Kurven einer Zelle des M-Typs vor (●) bzw. nach (○) Injektion von EGTA.

Auswärtsstromes. Das prozentuale Ausmaß dieser Reduktion war von Fall zu Fall sehr verschieden, und hing vor allem auch von der Höhe der Depolarisation ab. Abb. 4.4.2 zeigt die Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle, die besonders drastisch auf die Injektion reagierte. Abb. 4.4.3 veranschaulicht die typische Veränderung der Strom-Trajektorien, wobei die Beschleunigung der relativen Anstiegskinetik auffällt, sowie das Auftreten einer frühzeitigen Inaktivierung. Insgesamt erinnert der nach der Injektion verbleibende Strom ebenso wie auch die Form der Strom-Spannungs-Kennlinie bei mittleren bis höheren Potentialen an die Membranen des P-Typs.
Sehr drastisch ändert sich auch das Verhalten bei hohen Testdepolarisationen nach kleinen depolarisierenden Vorpulsen. Gerade bei Zellen, die vor der Injektion auf einen solchen Vorpuls mit einer kräftigen Erhöhung des Auswärtsstroms reagieren, ist nach der Injektion nur mehr eine Verminderung zu sehen, wie sie nach den üblichen Vorstellungen der Inaktivierung im Laufe einer Depolarisation (dem Vorpuls) auch zu erwarten ist. Abb. 4.4.4 zeigt ein typisches Beispiel für diese Umkehrung der Wirkung des Vorpulses.
Mehrmals konnten Zellen, in die EGTA injiziert worden war, noch bis mehrere Stunden nach der Injektion gehalten werden. Im Laufe dieser Zeit waren die Eigenschaften der Zellen nach den anfänglichen Änderungen völlig konstant. Dies zeigt einerseits, daß EGTA auf der Innenseite der Membran keinen auf Dauer schädlichen Einfluß ausübt, sowie andererseits, daß das EGTA die Zelle durch die Membran nicht in merklichen Ausmaß verlassen kann, da sonst ein Nachlassen der Wirkung des EGTA zu erwarten wäre. Durch diese Akkumulation des EGTA in der Zelle hat man die Möglichkeit, die Abhängigkeit zwischen interner EGTA-Konzentration und Auswärts-Strom zu verfolgen. Das Beispiel der Abb. 4.4.5 zeigt, daß die Empfindlichkeit ganz zu Beginn der Injektion offensichtlich am größten ist, eine Sättigung der Reaktion erfolgt jedoch erst bei weitaus höheren Konzentrationen. Bei der in diesem Experiment verwendeten mäßigen Depolarisation auf ein Potential, das etwa dem Spitzenwert des natürlichen Aktionspotentials entspricht, sind im Zeitverlauf des Auswärtsstroms keine auffälligen Veränderungen zu bemerken.
Die beschriebene, ins Auge fallende Veränderung des Zeitverlaufs des Auswärtsstromes bei hohen Depolarisationen nach Injektion von EGTA gleicht prinzipiell den Veränderungen im Laufe einer repetitiven Depolarisation bei geeigneten Reizparametern (siehe Kap. 4.2.). Abb. 4.4.6 zeigt Membranströme bei der Kombination beider Bedingungen. In der Kontrolle vor den Injektionen ist beim zweiten und mehr noch beim fünften Puls der Serie ohne Vorpuls die langsame Komponente inaktiviert, sowie die zunächst stromvergrößernde Wirkung in der unteren Serie in eine stromvermindernde umgekehrt.

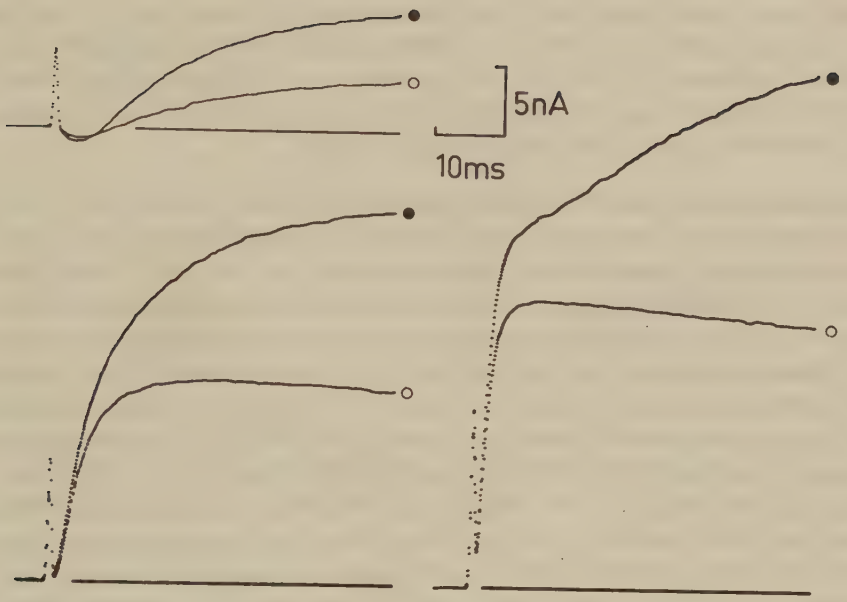


Abb. 4.4.3 Clampströme einer Zelle des M-Typs vor (●) bzw. nach (○) Injektion von EGTA bei Depolarisationen auf +1o, +5o und +9o mV.

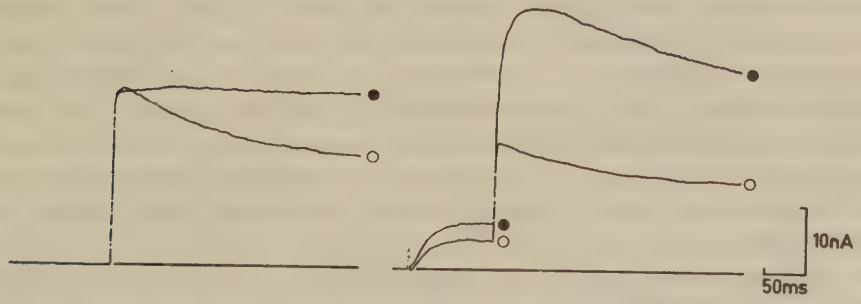


Abb. 4.4.4 Clampströme einer Zelle des M-Typs vor (●) bzw. nach (○) Injektion von EGTA bei Depolarisation auf +13o mV, jeweils ohne Vorpuls (links) bzw. mit einem Vorpuls auf o mV.

Beide Entwicklungen während der Serien werden durch die Injektionen von EGTA insoweit vorweggenommen, daß nunmehr die Ströme bereits beim ersten Puls die qualitativ gleiche Form haben wie vorher erst die letzten. Dies ist gleichbedeutend damit, daß die Injektionen zwar die Membranströme der ersten Pulse drastisch verändern, die der fünften jedoch praktisch unverändert bleiben.

Aus Experimenten mit dem Photoprotein Aequorin ist bekannt, daß bei den Zellen von Helix pomatia über einen weiten Potentialbereich der Depolarisation große, von Kalzium getragene Einwärtsströme fließen (Stinnakre und Tauc 1973, Lux und Heyer 1977). Unter Normalbedingungen manifestiert sich diese Stromkomponente jedoch nur in einem extrem kleinen Potentialbereich von wenigen mV als Netto-Einwärtsstrom, da bei höheren Depolarisationen dann sehr bald der Auswärtsstrom überwiegt. Außerhalb dieses Potentialbereichs konnte er nur indirekt als Defizit zwischen Netto-Strom und dem mit einer extrazellulären Kalium-sensitiven Mikroelektrode gemessenen Kalium-Efflux nachgewiesen werden (Heyer und Lux 1976a). Die Injektion von EGTA bietet dagegen die Möglichkeit, durch Reduktion der Auswärtsstrom-Komponente den Einwärtsstrom über einen wesentlich breiteren Potentialbereich direkt nachzuweisen. Eine völlig separierte Darstellung des Einwärtsstroms war jedoch in keinem Fall möglich, da immer ein Teil des Auswärtsstroms erhalten blieb. Abb. 4.4.7 zeigt typische Beispiele dieser Umkehrung von Netto-Auswärts zu Netto-Einwärts bei verschiedenen Depolarisationshöhen.
Bei Doppelpulsen, bzw. repetitiven Depolarisationen auf Potentiale um 0 mV fällt nach EGTA-Injektion die außergewöhnlich starke Depression des Netto-Stroms bei den späteren Depolarisationen auf (Abb. 4.4.8). Dies kann soweit gehen, daß bei zwei Depolarisationen auf das gleiche Potential der erste Puls Netto-Auswärts gerichtet ist, der zweite Puls dagegen Netto-Einwärts. Die jeweils nach der Rückkehr auf das Ruhepotential fließenden sog. "Tail"-Ströme sind dagegen in beiden Fällen nahezu identisch und vor allem in beiden Fällen deutlich auswärts gerichtet. Aus dieser Beobachtung lassen sich zwei wichtige Schlußfolgerungen ziehen. Zum einen muß der Einwärtsstrom bei Repolarisation der Membran außerordentlich schnell abschalten, so daß der Abschaltvorgang selbst im kapazitiven Artefakt verborgen bleibt, während die Abschaltzeitkonstante des Auswärtsstroms bei -50 mV mit ca. 20 ms recht lang ist. Die Größe der Auswärtstails ist so ein Maß für die Aktivierung des Auswärts-Strom-Systems, die am Ende beider Pulse offenbar nahezu gleich ist, d.h. auch die Größe der Auswärtsstromkomponente selbst ist bei beiden Pulsen etwa gleich. Um dennoch die beobachtete drastische Verminderung des Netto-Stroms zu erklären, muß eine

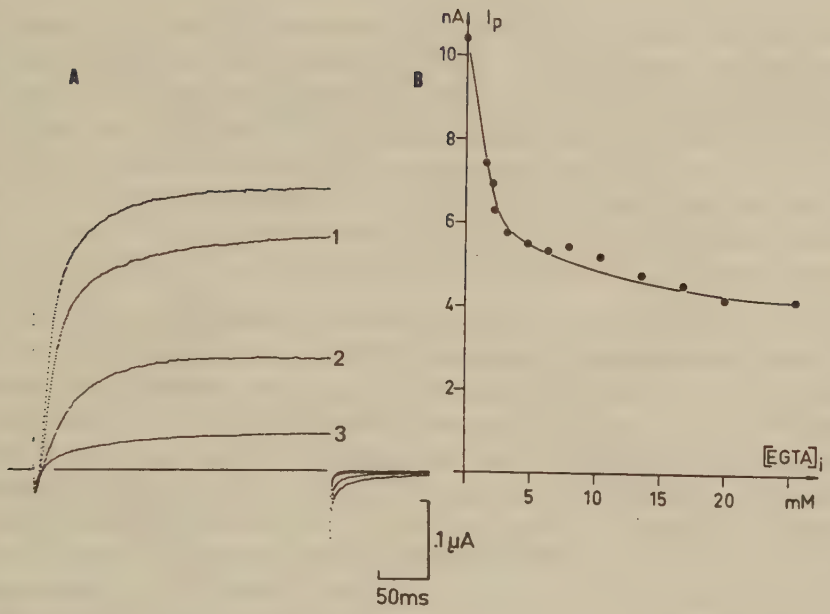


Abb. 4.4.5 Abnahme des Auswärtsstroms in Abhängigkeit von der injizierten EGTA-Menge. A: Depolarisation auf +5o mV, $[EGTA]_i$ 1 mM (1), 3 mM (2), 1o mM (3). B: Andere Zelle, Depolarisation auf +3o mV, Maximalwerte.

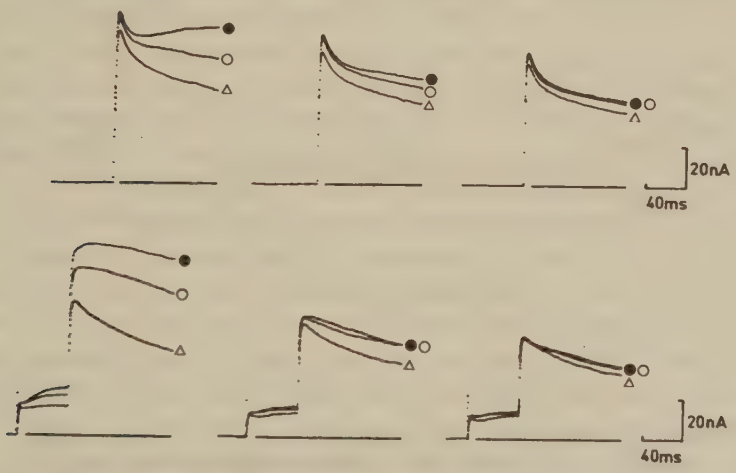


Abb. 4.4.6 Clampströme bei repetitiver Depolarisation auf +13o mV und Injektion von EGTA. Dargestellt ist jeweils der 1., 2. und 5. Puls der Serien mit Pausen von 1 s. Vorpulse auf +4o mV. (●) vor, (○) nach, (△) nach weiterer Injektion.

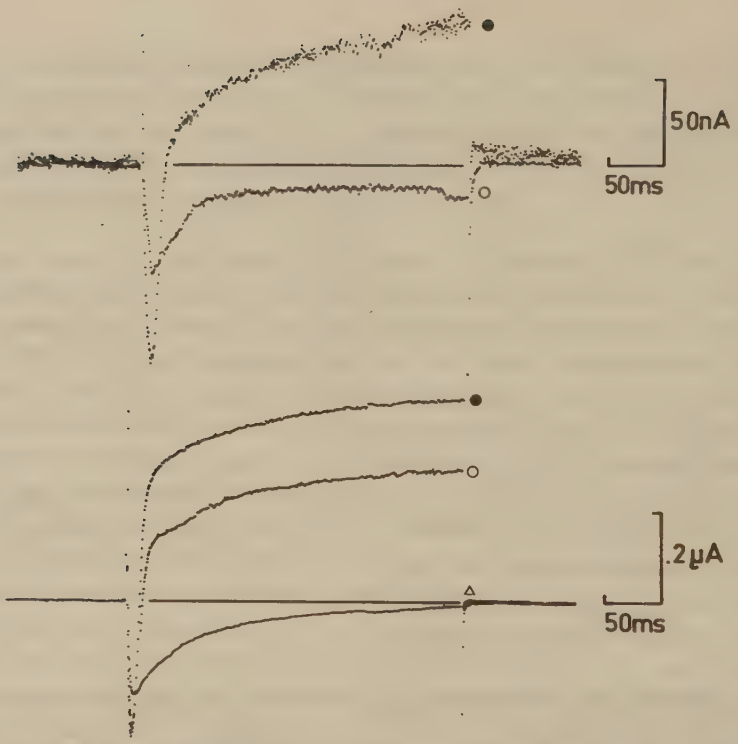


Abb. 4.4.7 Direkter Nachweis des persistierenden Auswärtsstroms über einen größeren Potentialbereich nach Injektion von EGTA. Depolarisation oben auf -1o mV, unten auf +1o mV. (●) vor, (○) nach, (△) nach weiterer Injektion.

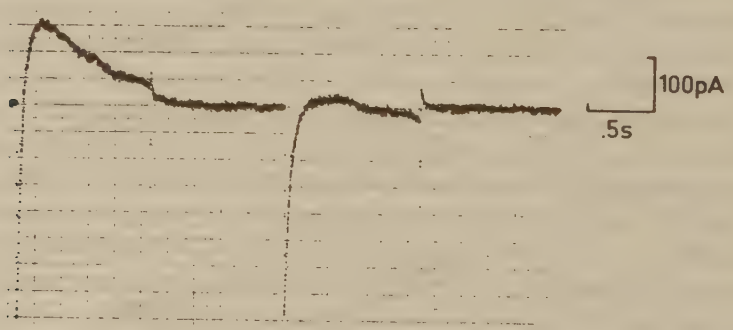


Abb.4.4.8 Doppelpulse auf -1o mV nach Injektion von EGTA. Zu beachten der auswärts gerichtete Tailstrom auch nach dem zweiten Puls, trotz einwärts gerichtetem Nettostrom am Ende dieses Pulses.

Vergrößerung der Einwärts-Stromkomponente beim zweiten Puls angenommen werden. Dies kann als weitere Demonstration der von Heyer und Lux (1976a) aufgrund von Messungen mit Kalium-sensitiven Mikroelektroden postulierten Fazilitierung des Einwärtsstroms bei repetitiver Depolarisation gesehen werden. Als zusätzliches Ergebnis zeigt die Beobachtung, daß diese Fazilitierung nicht Folge einer Akkumulation von Kalzium an der Innenseite der Membran sein kann, da dieses durch das injizierte EGTA ja sehr effektiv abgepuffert wird. Die Fazilitierung muß daher ein Ergebnis der Depolarisation per se oder des Kalzium-Stromflusses durch die Membran sein.

Die Verwendung einer Mischung von KCl mit K-Citrat als Elektrodenfüllung im Verhältnis 1:9 verbessert die Eigenschaften solcher Elektroden gegenüber Elektroden, die nur mit KCl gefüllt sind. Insbesondere bei der Verwendung als Stromelektroden im Voltage-Clamp sind Citrat-gefüllte Elektroden besser in der Lage, die bei größeren Zellen notwendigen Ströme von mehreren μA auch während Depolarisationen von einigen Sekunden zu tragen. Da es sich bei den Clamp-Strömen ganz überwiegend um Auswärtsströme der Membranen handelt, also um die Injektion von K^+-Ionen aus der Elektrode, ist das Citrat-Ion in diesem Fall am Ladungstransport nicht direkt beteiligt. Seine Wirkung beruht vielmehr darauf, daß es für Kalzium eine relativ hohe Stabilitätskonstante von $p_K = 8.02$ der Komplexreaktion $Ca^{2+} + 2\ HCitrat^{3-} \rightleftharpoons Ca(HCitrat)_2^{2-}$ hat (Heinz 1951, Davies und Hoyle 1955). Es wirkt durch diesen Entzug des Kalziums in der Elektrodenspitze einer Blockierung durch die intrazellulären Proteine entgegen. Im normalen Voltage-Clamp findet Transport von Citrat-Ionen ins Zellinnere praktisch nur durch Diffusion aus der sehr feinen Elektrodenspitze statt, wobei zusätzlich die immer am Glas anhaftenden negativen Festladungen (Krischer 1969) den Anionen-Transport behindern. Anders ist die Situation bei iontophoretischer Injektion von Kationen wie z.B. TEA im Voltage-Clamp mit Stromfluß zwischen einer Injektionselektrode und der Clamp-Stromelektrode. In diesem Falle wird im wesentlichen TEA-Citrat injiziert, da die von der Stromelektrode gelieferten Anionen gemäß der relativen Beweglichkeiten und Konzentrationen von $Citrat^-$ und Cl^- vor allem Citrat-Anionen sind. Es wurde daher zur Kontrolle untersucht, ob sich auch die Injektion von K-Citrat allein auf die Auswärtsströme bemerkbar macht. Abb. 4.4.9 zeigt, daß nach Injektion von K-Citrat bei repetitiver Depolarisation in erster Linie der Strom des jeweils ersten Pulses deutlich kleiner wird, während die Wirkung beim fünften Puls nur noch gering ist. Es wird also ebenso wie bei der Injektion von EGTA primär die Komponente des Auswärts-Stromes betroffen, die im Laufe eines Trains von Depolarisationen die Depression zeigt. Ebenso kann auch die stromer-

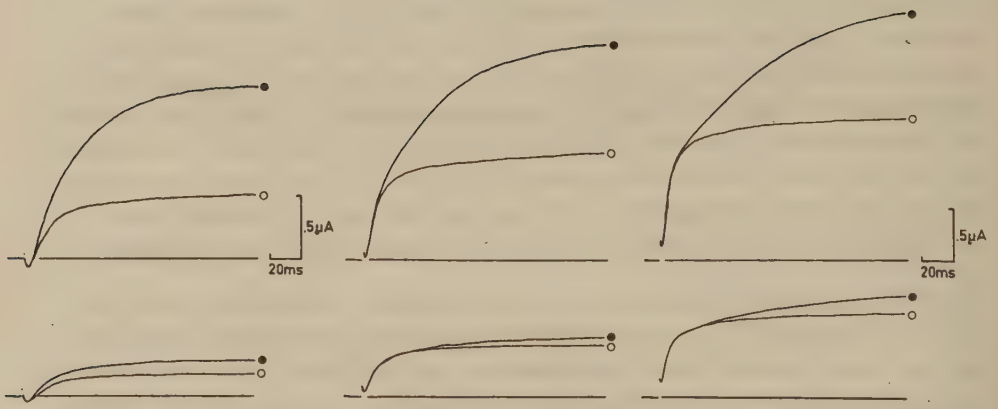


Abb. 4.4.9 Clampströme bei repetitiver Depolarisation (tp=1 s) vor (●) bzw. nach Injektion von Kaliumcitrat. Oben jeweils 1. Puls, unten 5. Puls einer Serie. Depolarisationen (von links): +3o, +5o, +7o mV.

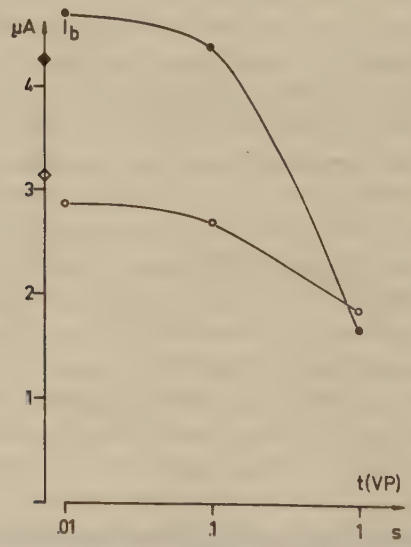


Abb. 4.4.1o Beschränkung der bimodalen Wirkung depolarisierender Vorpulse auf +2o mV auf ausschließlich depressive Wirkung durch Injektion von Kaliumcitrat. (●) vor, (○) nach Injektion, (◆) bzw. (◇) Kontrollen ohne Vorpuls. Testdepolarisation auf +11o mV.

höhende Wirkung von kleinen depolarisierenden Vorpulsen bei hohen Testpulsen durch die Injektion von K-Citrat unterdrückt werden. Abb. 4.4.10 zeigt, daß nach der Injektion durch Vorpulse jeglicher Länge ausschließlich eine Verminderung des Auswärtsstroms bewirkt wird, während die gleiche Membran vor der Injektion das schon beschriebene bimodale Verhalten in Abhängigkeit von der Länge des Vorpulses zeigte. Die nach einem 1 s dauernden Vorpuls verbleibende Stromkomponente zeigt dagegen offensichtlich keine Reaktion auf die Injektion.

4.5. Variation der divalenten Kationen in der Badlösung

4.5.1. Variation des $[Ca^{2+}]_o$

Die Variation der äußeren Ca-Konzentration erscheint zunächst als die direkteste Methode, um quantitativ die Effekte dieses Ions auf die Membranströme zu untersuchen. Es ergeben sich dabei jedoch zwei prinzipielle Schwierigkeiten. Auch nach weitestgehender Präparation und dem Einsatz des Enzyms Pronase ist die eigentliche Membran noch von einer Bindegewebshülle umgeben, die große Mengen von leicht freisetzbarem Kalzium komplexgebunden enthält. Eine definierte Verminderung von $[Ca^{2+}]_o$ ist unter diesen Umständen sehr erschwert, und es dauert auch sehr lange, bis konstante niedrige Kalzium-Spiegel erreicht sind.
Im Bereich von 10 µM/l bis 10 nM/l läßt sich unter Einsatz von EGTA die Ca-Konzentration verläßlich abpuffern (Portzehl et al.1964). Bei diesen geringen Konzentrationen kann das Ca-Ion aber auch seine schon länger bekannte sogenannte membranstabilisierende Funktion (Frankenhaeuser und Hodgkin 1957) nicht mehr ausüben. Die Membranen wurden in solchen Pufferlösungen zunehmend leck und schließlich irreversibel geschädigt. Nach Vorversuchen wurde daher auf diesen Weg verzichtet und die Variation von $[Ca^{2+}]_o$ nur im Bereich von 0.3 mM/l bis 30 mM/l untersucht, wobei jeweils mit Magnesium substituiert wurde. Der Wert von 0.3 mM/l ist nach dem eingangs gesagten dabei nicht als exakt an der Membran gültig anzusehen.
Bei den Membranen des C-Typs hat eine solche Variation von $[Ca^{2+}]_o$ die deutlichsten Effekte. Abb. 4.5.1. zeigt einige charakteristische Strom-Trajektorien sowie die I-V-Diagramme einer solchen Membran in Lösungen mit verschiedener Ca-Konzentration. Es ist offensichtlich, daß das Potential des maximalen Auswärtsstroms der in Normalringer N-förmigen Strom-Spannungs-Kurve eine Funktion der Ca-Konzentration ist, wobei die für 30 mM/l $CaCl_2$ gültige Kurve bis zu den höchsten Depolarisationen monoton ist. Die beiden im Abstand von etwa 10 min aufgenommenen Diagramme bei

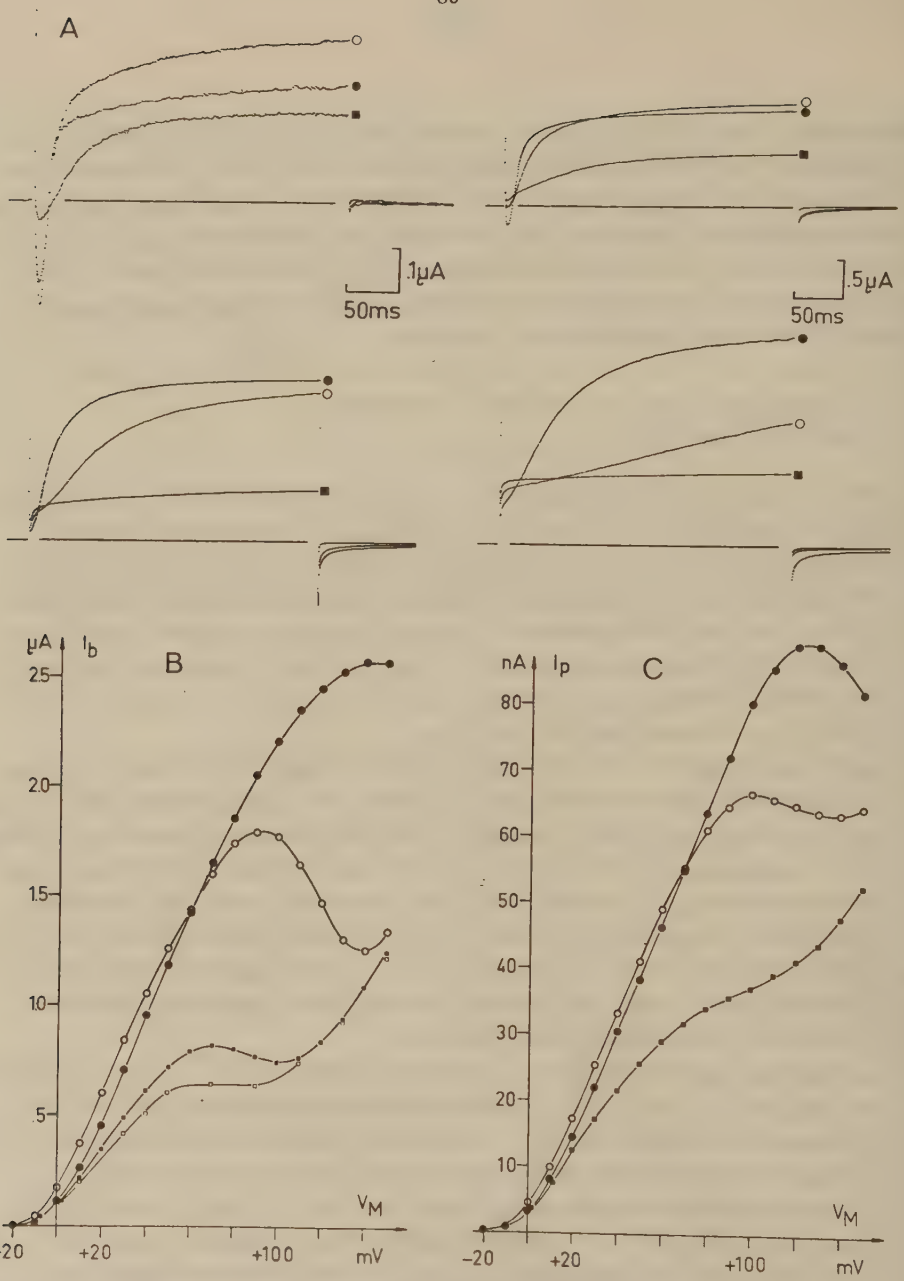


Abb. 4.5.1 Clampströme und isochrone (t=1oo ms) I-V-Kurven in 3o (●), 3 (○) und o.3 (■) mM Ca^{2+}. A: Zelle vom Typ C, Depolarisationen auf +1o, +5o, +9o und +13o mV. B: I-V-Kurven zu A (gleiche Symbole). Zusätzlich ist eine weitere Messung in o.3 mM Ca^{2+} eingezeichnet (□), die etwa 1o min nach (■) aufgenommen wurde. C: I-V-Kurven einer Burster-Zelle unter gleichen Bedingungen.

0.3 mM/l $CaCl_2$ verdeutlichen die langsame Äquilibrierung solch niedriger Konzentrationen. Aus den Ström-Trajektorien wird ersichtlich, daß in diesen Lösungen die Leckströme, besonders bei hohen Depolarisationen, bereits merklich erhöht sind. Bei den Membranen des M-Typs ergibt sich qualitativ das gleiche Bild, entsprechend der offensichtlich geringeren Ca-Empfindlichkeit dieser Zellen wird aber hier auch in 30 mM/l $CaCl_2$ das Strommaximum boch deutlich überschritten, während in 0.3 mM/l die Nichtlinearität der IV-Kurve nur noch minimal ist.

4.5.2. Andere Elemente der Erdalkali-Gruppe

Wie angegeben, wurde bei den Experimenten von 4.5.1. Kalzium gegen Magnesium ausgetauscht. Da Magnesium in diesen Serien also in einer Konzentration bis zu 30 mM/l vorhanden war, ist es offensichtlich nicht in der Lage, das Ca-Ion zu ersetzen. An den Stromspuren von Abb. 4.5.1 ist zu erkennen, daß es auch nicht in der Lage ist, die Membran in nennenswertem Umfang als Einwärtsstrom zu passieren. Dieses Ion wurde daher nicht weiter untersucht.
Das in der 5. Periode des Systems der Elemente über Kalzium stehende Strontium scheint qualitativ dagegen sehr ähnlich zu wirken wie Kalzium, was übrigens auch für andere physiologische Systeme, wie z.B. den Knochenbau (s. Karlson 1972, p. 349) und die elektromechanische Kopplung am Muskel (Hartmann und Reiter 1965) gilt. Abb. 4.5.2 zeigt in 20 mM/l $SrCl_2$ beim Vorpuls einen erhöhten Einwärts-Strom gegenüber Normalringer, doch ist der bei der hohen Testdepolarisation maximal erzielbare Auswärts-Strom deutlich kleiner als dort. Er bleibt aber dann für eine Sekunde völlig konstant, während in Normalringer eine Inaktivierung auf etwa 80% des Maximalwertes eintritt. Das Sr-Ion permeiert die Membran also besser als Ca, der aktivierende Effekt auf den Auswärtsstrom ist dagegen etwas geringer. Im Verlauf von Strom-Spannungs-Kennlinien sind qualitativ keine deutlichen Unterschiede zu normalen Ca-Lösungen auffällig (Abb. 4.5.2.B).
In der Reihe der Erdalkali-Metalle folgt in der 6. Periode das Barium. Die membranphysiologischen Wirkungen seines Ions wurden schon in mehreren Präparaten untersucht, in allen Fällen ergab sich ein erhöhter Einwärtsstrom bzw. ein verminderter Netto-Ausstrom (Sperelakis et al. 1967, Hagiwara et al. 1974, Eckert und Lux 1976, Heyer und Lux 1976, Ducreux und Gola 1977).

Speziell wurde bei der Untersuchung des persistierenden Einwärts-Strom-Systems an Helix pomatia eine starke Vergrößerung dieser Stromkomponente in Ba-Ringer gefunden. (Eckert und Lux 1976). Da im größeren Teil des physiologischen Potentialbereichs

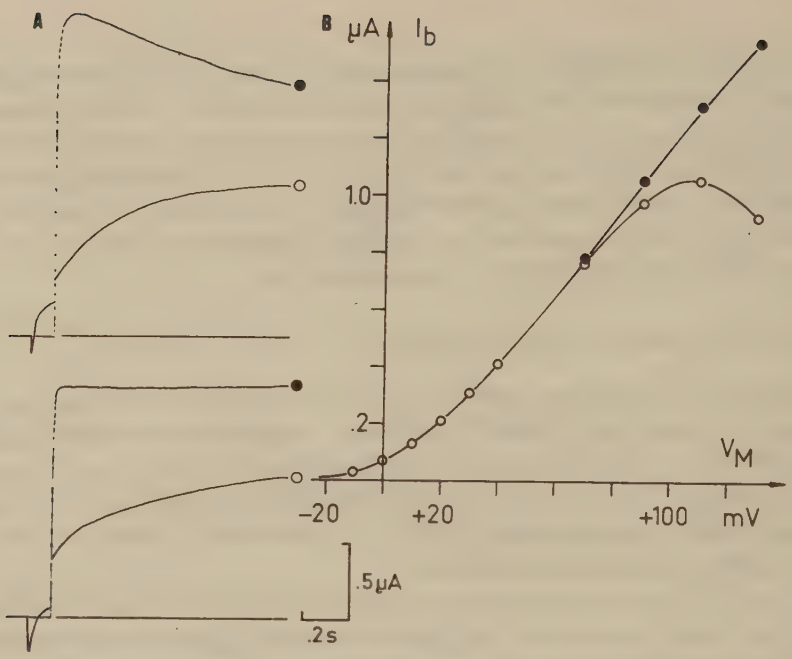


Abb. 4.5.2 Clampströme und I-V-Kurven in 2o mM Sr^{2+}. A: Testdepolarisation +13o mV, Vorpuls +1o mV; oben: NR, unten: Sr^{2+}. (○) ohne, (●) mit Vorpuls. B: Isochrone (t=1oo ms) I-V-Kurven in Sr^{2+} ohne (○) bzw. mit (●) Vorpuls auf +1o mV/1oo ms.

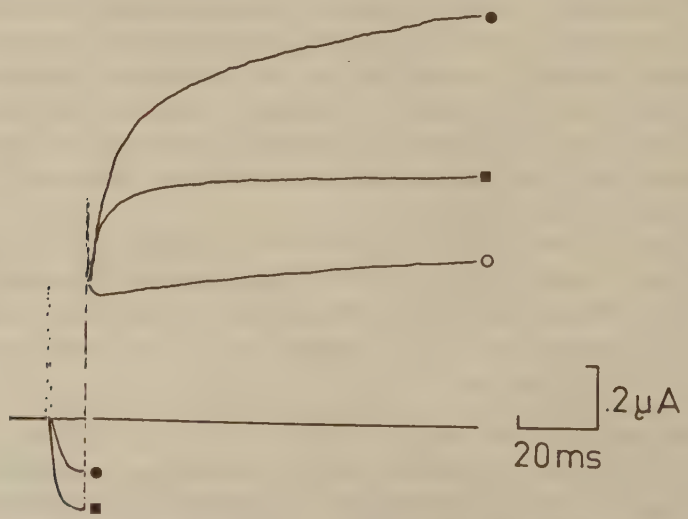


Abb. 4.5.3 Clampströme in 2o mM Ba^{2+}. Testdepolarisation +15o mV, Vorpuls +2o mV. (■) NR mit Vp, (●) Ba^{2+} mit Vp, (○) NR ohne Vp.

jedoch Einwärts- und Auswärts-Ströme die Membran gleichzeitig passieren, ist i.A. aus den im Clamp gemessenen Nettoströmen allein kein Aufschluß über das Verhalten der einzelnen Stromkomponenten zu gewinnen. Ein Ansatz zur Klärung dieser Frage wurde daher auf drei verschiedenen Wegen unter zusätzlichen Bedingungen versucht. Analog zum Vorgehen beim Sr-Ion wurde der Strom bei hohen Depolarisationen, bei denen der Einstrom von Ba sicher klein ist, nach depolarisierenden Vorpulsen untersucht. Abb. 4.5.3 zeigt den Vergleich zwischen Normalringer und 20 mM/l $BaCl_2$. Das Ergebnis ist qualitativ das gleiche wie in Sr, jedoch noch wesentlich ausgeprägter. Der Einwärtsstrom während dem Vorpuls ist gegenüber dem Kontrollwert etwa 1.8 mal größer, die damit verbundene Aktivierung des Auswärtsstroms dagegen mehr als halbiert (unter Berücksichtigung eines konstanten Leckstromes). In weit stärkerem Maße noch als Sr vermag Ba ohne Wechselwirkung mit dem den Auswärtsstrom tragenden System die Membran zu passieren. Lux und Hever (1979 und pers. Mitt.) kamen gleichzeitig unter Einsatz einer quantitativ exakten, technisch äußerst anspruchsvollen Methode zum gleichen Ergebnis bezüglich Barium, und konnten zusätzlich nachweisen, daß Magnesium, bei kleineren Einwärtsströmen als Kalzium, ebenfalls eine Aktivierung des Auswärtsstroms bewirken kann.

Die zweite Methode bestand in der Anwendung von Ba-Ringer auf Zellen, in die EGTA injiziert worden war. Wie in Kap. 4.4. gezeigt wurde, wird dadurch die Ca-empfindliche Auswärts-Strom-Komponente sehr wirksam vermindert, so daß im Nettostrom die Einwärts-Komponente stärker betont wird. Abb. 4.5.4 zeigt, daß bei den kleinsten Depolarisationen eine Verkleinerung des Einwärtsstroms auch bei mehrfachen Depolarisationen nicht festzustellen ist. Eine solche tritt erst ab etwa -20 mV auf. Aus dem Vergleich mit den weiteren Spuren bei noch höheren Potentialen geht jedoch hervor, daß es sich dabei um die Aktivierung einer entgegengerichteten Auswärtsstrom-Komponente handelt, die durch die EGTA-Injektion nicht blockiert wurde und ihrerseits im Verlauf der Pulsfolge stark inaktiviert. Dies wird noch deutlicher bei den langen Doppelpulsen der Abb. 4.5.5 und den extrem langen Depolarisationen in Abb. 4.5.6. Diese Abbildungen zeigen auch, daß der Einwärtsstrom sich wiederum aus zwei Komponenten zusammensetzt, wobei der transiente Teilstrom in allen Fällen erst bei deutlich höheren Potentialen einschaltet.

Da EGTA auch Ba-Ionen mit einem p_{K_a} = 8.4 (Sillén und Martell 1964) sehr effektiv komplexiert und damit die freie Ba-Konzentration im Zellinnern trotz des hohen Einstroms durch die Membran bei den Depolarisationen niedrig gehalten wird, tritt bei den so injizierten Zellen die blockierende Wirkung des Barium auf die nur potentialabhängige Komponente des Auswärtsstroms nicht auf, die unter normalen Bedingungen eine starke Verminderung des K-Efflux in Ba-haltigen Badlösungen zur Folge hat (Lux, pers. Mitt.). Die in Abb. 4.5.7 demonstrierte Parallelverschiebung der Ströme um 170 pA bzw. um 370 pA bei gleichbleibender Kinetik stellt also einfach die Ver-

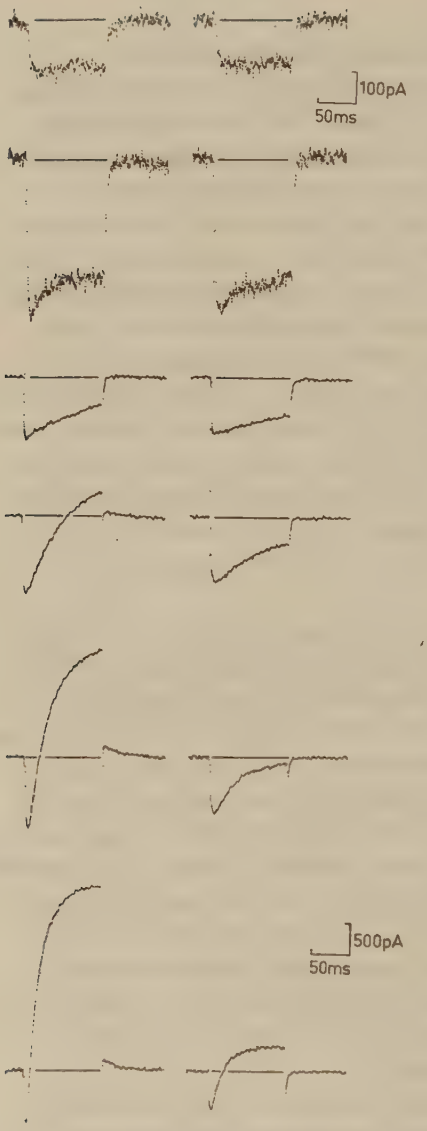


Abb. 4.5.4 Repetitive (tP=3oo ms) Depolarisationen in 2o mM Ba^{2+} von -3o mV in Schritten von 1o mV ansteigend (von oben nach unten). Jeweils 1. (links) und 1o. Puls jeder Serie.

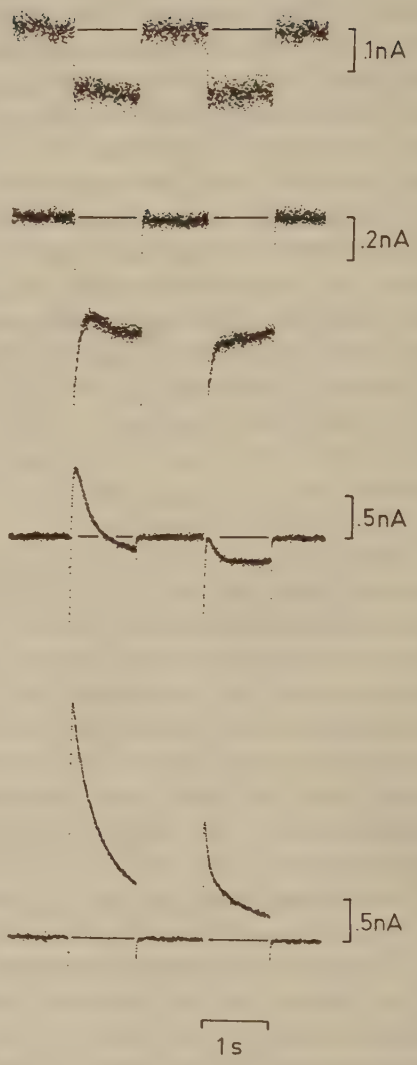


Abb. 4.5.5 Doppelpulse in 2o mM Ba^{2+}. Von oben: -3o, -1o, +1o und +3o mV.

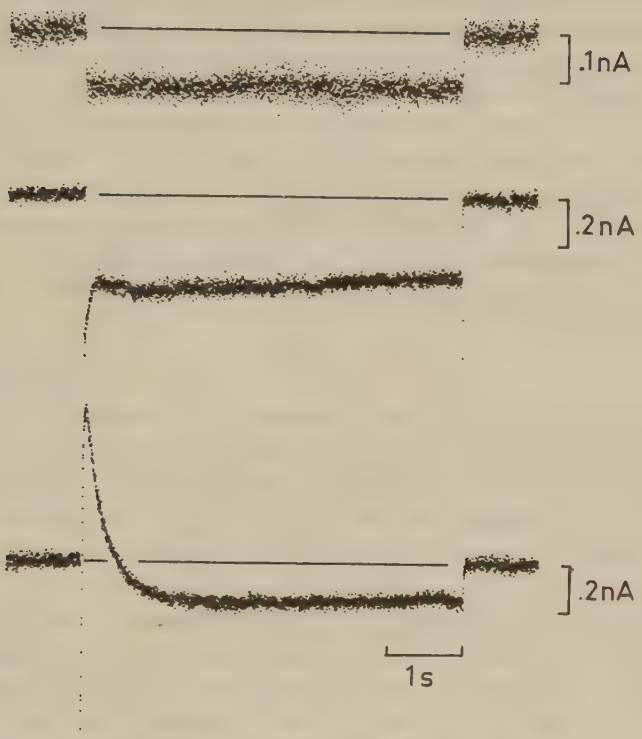


Abb. 4.5.6 Lange Depolarisationen in 2o mM Ba^{2+}. Von oben: -2o, -1o und +1o mV.

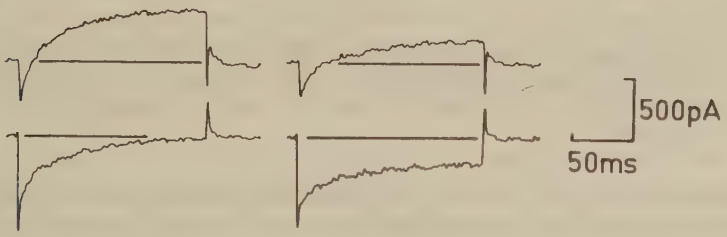


Abb. 4.5.7 Vergleich der Kinetiken des Stromverlaufs bei repetitiven (t_P=3oo ms) Depolarisationen auf -1o mV bei Übergang von Normalringer (oben) zu 2o mM Ba^{2+}. Jeweils 1. (links) und 1o. Puls einer Serie.

größerung des persistierenden Einwärtsstroms (Lux und Eckert 1975) um eben diese Beträge beim Übergang von Normalringer zu einer Lösung mit 20 mM/l $BaCl_2$ dar. Aus dem Vergleich der Einwärtsspitzenströme ist zu schließen, daß der Einwärtsstrom in diesen Lösungen etwa doppelt so groß wie in Normalringer ist.

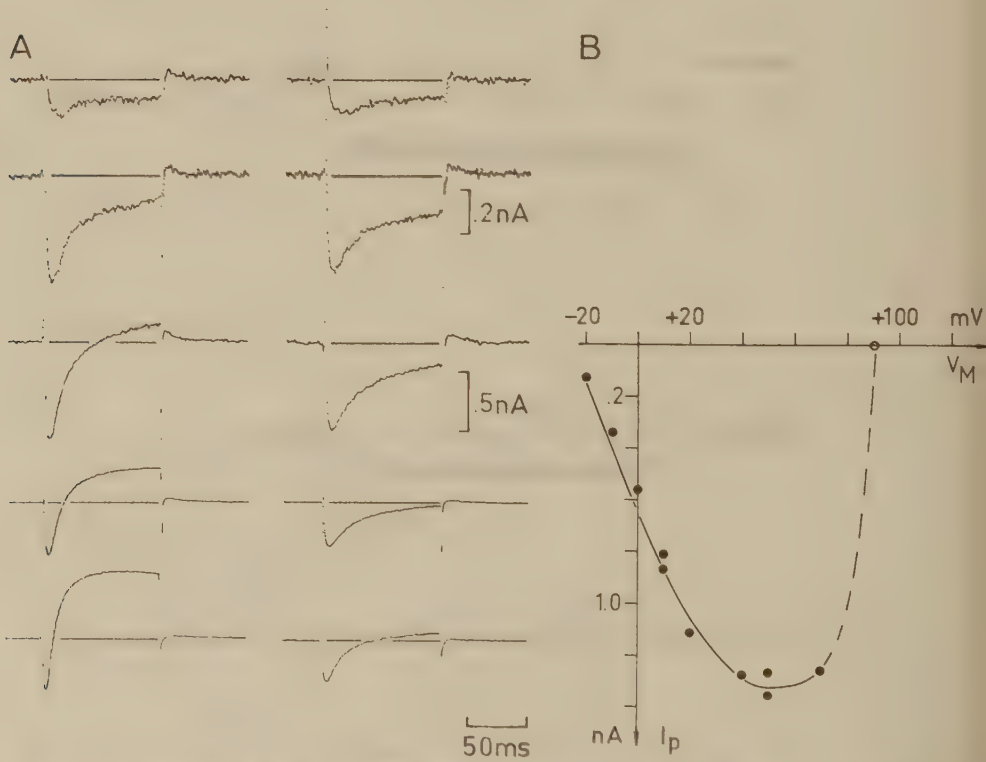


Abb. 4.5.8 Repetitive (t_p = 300 ms) Depolarisationen einer mit EDTA injizierten Burster-Zelle in 20 mM Ba^{2+}. A: Jeweils 1. (links) und 10. Puls einer Serie, von -20 in Schritten von 10 mV ansteigend (von oben). B: Verlauf des Einwärtsstroms in Abhängigkeit von der Amplitude der Depolarisation bei Anwendung der im Text genannten Annahmen.

Eine Abschätzung des Ba-Einstroms über einen größeren Potentialbereich kann man erhalten, wenn die in 4.8. erläuterte Beobachtung herangezogen wird, daß die Inaktivierung der nach EGTA-Injektion verbleibenden Komponente des Auswärtsstroms

nicht potentialabhängig ist. Mittels repetitiven Depolarisationen auf sehr hohe Potentiale (+110 mV), bei denen der relative Anteil des Ba-Einstroms vernachlässigbar klein ist, wird auf den Inaktivierungsverlauf dieser Komponente geschlossen. Die zweite notwendige Annahme der Konstanz des Ba-Einstroms im Verlauf der jeweiligen Pulsfolgen ist bis zu Potentialen von -10 mV aus den Abbildungen unmittelbar zu ersehen. Die Werte des Ba-Einstroms, für die sich ein optimaler Fit mit den experimentellen Nettoströmen ergibt, sind im Diagramm der Abb. 4.5.8.B eingetragen. Der Ba-Einstrom erreicht sein Maximum also erst bei relativ hohen Potentialen von mehr als +50 mV, was in Einklang steht mit den Ergebnissen von Messungen des Ca-Influx unter Anwendung des Photoproteins Aequorin (Lux und Heyer 1977).

4.5.3. Obergangsmetalle

Die beiden ersten Elemente der 4. Periode, Kalium und Kalzium, bauen ihre neu hinzukommenden Elektronen in der 4. Elektronenschale ein, obwohl die 3. Schale mit ihren 8 Elektronen noch nicht gesättigt ist, sondern gemäß der für n = 3 geltenden maximalen Elektronenzahl $2 \times n^2 = 18$ insgesamt noch weitere 10 Elektronen aufnehmen kann. Diese Schale wird erst bei den auf Kalzium folgenden sog. Obergangselementen aufgefüllt, die in der 4. Schale alle die gleichen 2 Valenzelektronen wie Kalzium haben. Einige dieser Obergangselemente sind dafür bekannt, an biologischen Membranen mit den physiologischen Kalzium-Strömen zu interferieren. Untersucht wurden Mangan (8+5 Elektronen in der 3. Schale), Kobalt (8+7) und Nickel (8+8). In der 6. Periode folgt auf Barium mit 2 Elektronen in der 6. Schale und 8 in der 5. das Lanthan mit 9 Elektronen in der 5. Schale. Dieses zusätzliche Elektron wird leicht abgegeben, so daß das Lanthan-Ion 3-wertig ist. Als ebenfalls schon vielfach verwendetes Ion wurde es in die Untersuchungen mit einbezogen.
Als Blocker des Kalzium-Einstroms ist vor allem Kobalt in der Membranphysiologie seit längerem bekannt. Auch die Verminderung eines Kalzium-abhängigen Teils des Auswärtsstroms durch Kobalt wurde bereits nachgewiesen (Meech und Standen 1975, Heyer und Lux 1976), die sich in Strom-Spannungs-Kennlinien wie denen der Abb. 4.5.9.A manifestiert.
Zusätzlich wurde nun das Verhalten der Membranen bei hohen Depolarisationen nach der in Kap. 4.2. beschriebenen Methode untersucht. Als möglicher Wirkungsmechanismus der dabei verwendeten Vorpulse käme eine direkte Wirkung des Potentialsprungs auf die Ionenkanäle der Membran prinzipiell ebenso in Frage, wie andere dadurch ausgelöste sekundäre Vorgänge. Die Strom-Trajektorien der Abb. 4.5.9.B zeigen, daß es

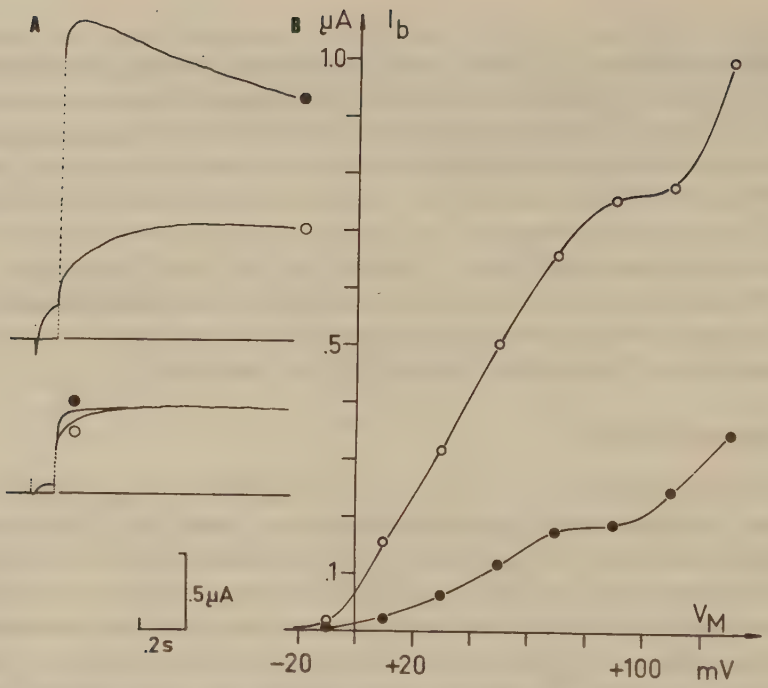


Abb. 4.5.9 Clampströme und isochrone (t=1oo ms) I-V-Kurven in 2o mM Co^{2+}.
A: Testdepolarisation +13o mV, Vorpuls +1o mV; oben: NR, unten: Co^{2+}; (○) ohne, (●) mit Vorpuls. B: I-V-Kurven in NR (○) bzw. in Co^{2+} (●).

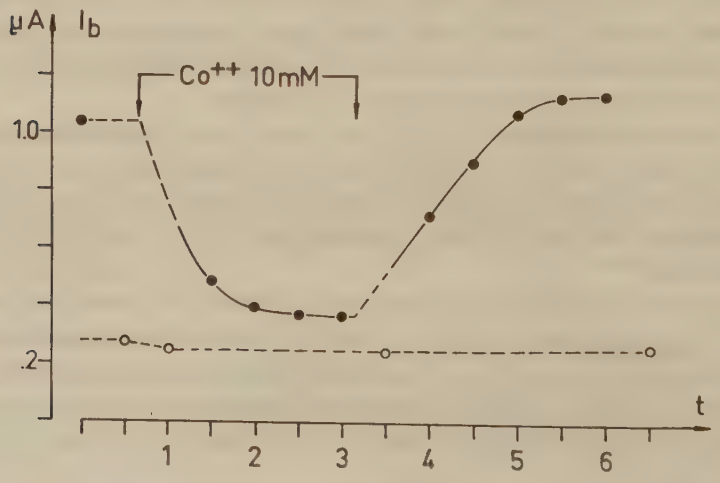


Abb. 4.5.1o Austauschkinetik bei Perfusion des Bades mit Co^{2+}-Ringer.
Testdepolarisationen +13o mV, Ströme bei t=1oo ms gemessen.
(○) ohne Vorpuls, (●) mit Vorpuls 5o ms auf +1o mV.

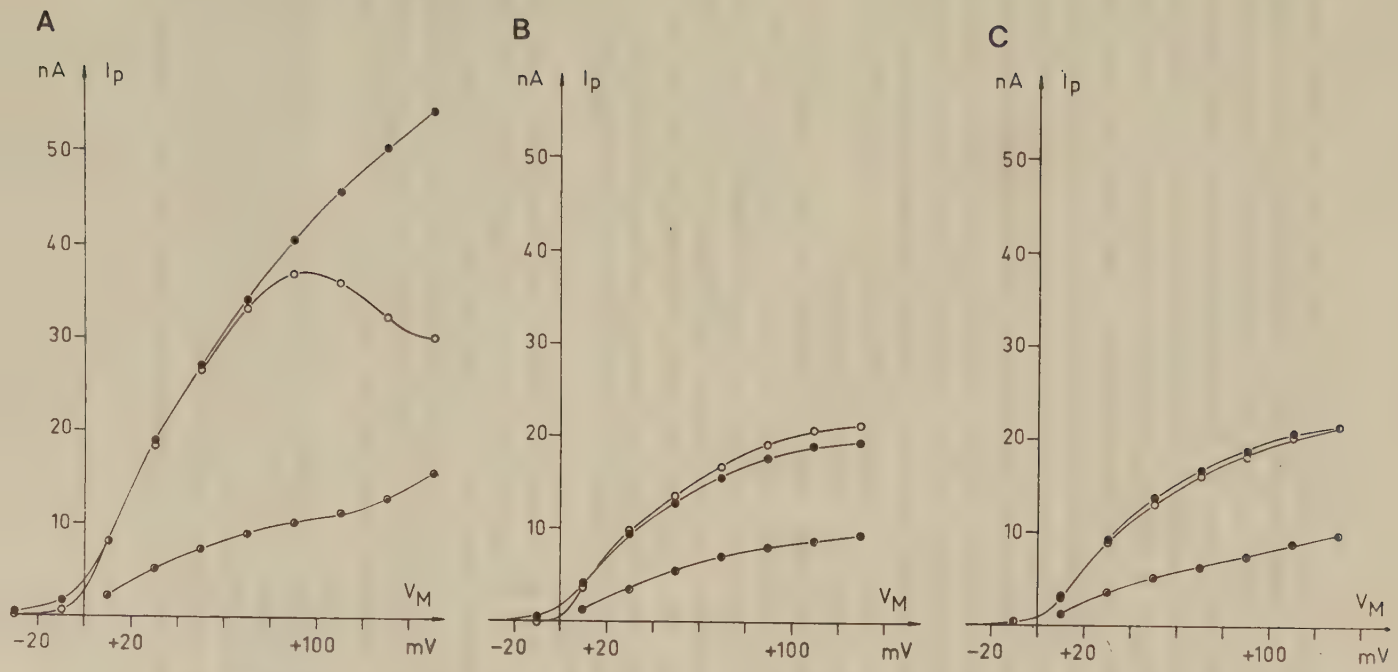


Abb. 4.5.11 Isochrone (t=5o mS) I-V-Kurven in NR (A), in NR nach Injektion von EGTA (B) sowie danach in 2o mM Co^{2+} (C). (o) ohne Vorpuls, (●) mit Vorpuls o mV/4o ms. Repetitive (tp=3oo ms) Depolarisationen von je 1oo ms, obere Kurven jeweils 1. Puls, untere 1o. Puls einer Serie.

offensichtlich nicht die Depolarisation per se ist, die die Aktivierung beim Testpuls ermöglicht. Die enorme Vergrößerung des Auswärts-Stroms in Normal-Ringer nach einem Vorpuls (relativ zum Strom ohne Vorpuls) geht in Kobalt fast völlig verloren. Gleichzeitig ist auch der Strom während dem Vorpuls wesentlich kleiner und die Einwärts-Spitze des Stroms ist verschwunden. Dies ist ein starkes Indiz dafür, daß die Wirkung der Vorpulse durch Kalzium-Ionen vermittelt wird, die während dem Vorpuls durch die Membran einströmen. Dabei wirkt das Kobalt primär an der Außenseite der Membran, wie aus der Kinetik des Wirkungseinsatzes beim Austausch der Lösungen zu schließen ist. Bei dem in Abb. 4.5.10 gezeigten Experiment wurden Einsatz und Abklingen der Co-Wirkung mit der Vorpuls-Methode verfolgt; die Zeitkonstante des Austauschs in beiden Richtungen liegt bei etwa 60 s und damit durchaus in der Größenordnung, die als Diffusionszeit unter Berücksichtigung der Bindegewebsschicht um die eigentliche Zellmembran angenommen werden kann. Sie ist vor allem kurz gegen die anhaltende Wirkung nach der intrazellulären Injektion von Co-Ionen, wie sie in Kap. 4.7. beschrieben sind.

In der differentiellen Konduktivität der Membranen bei hohen Testpulsen tritt erwartungsgemäß in Co-haltigen Lösungen durch einen Vorpuls ebenfalls keine Änderung mehr auf. Während zudem in Normalringer bei Depolarisationen auf etwa +130 mV im Laufe der Depolarisation von einer Sekunde das Auswärtsgleichrichtungsverhältnis noch abnimmt (vgl. Kap. 4.3.) ist dies bei Co praktisch nicht mehr der Fall. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß die Änderung des momentanen Verhaltens in Normalringer auf den wenn auch geringen Einstrom von Ca-Ionen noch während der Depolarisation zurückzuführen ist.

Untersucht wurde auch die Wirkung von Co-Ringer auf Zellen,in die vorher EGTA injiziert worden war. Die IV-Kennlinien in Abb. 4.5.11 zeigen, daß nach der drastischen Reduktion der Auswärts-Ströme durch die Injektion sowie der ebenso deutlichen Verminderung der Reaktion auf einen depolarisierenden Vorpuls durch Austausch des Ca in der Badlösung mit Co keine weiteren Änderungen mehr auftreten. Auch die Form der Strom-Trajektorien wurde kaum mehr verändert, lediglich der transiente Einwärtsstrom war unterdrückt.

Nickel mit 8+8 Elektronen in der 3. Schale wurde bisher noch kaum verwendet und daher in der vorliegenden Untersuchung zu Vergleichszwecken mit herangezogen. Wie Abb. 4.5.12.A zeigt, ist die Blockade des Ca-Einstroms durch Ni-Ionen nach den bisher besprochenen Tests ebenso vollständig wie durch Co-Ionen. Bei Membranen des M-Typs kehrt sich unter Ni die Vergrößerung des Stroms bei hohen Testpulsen durch

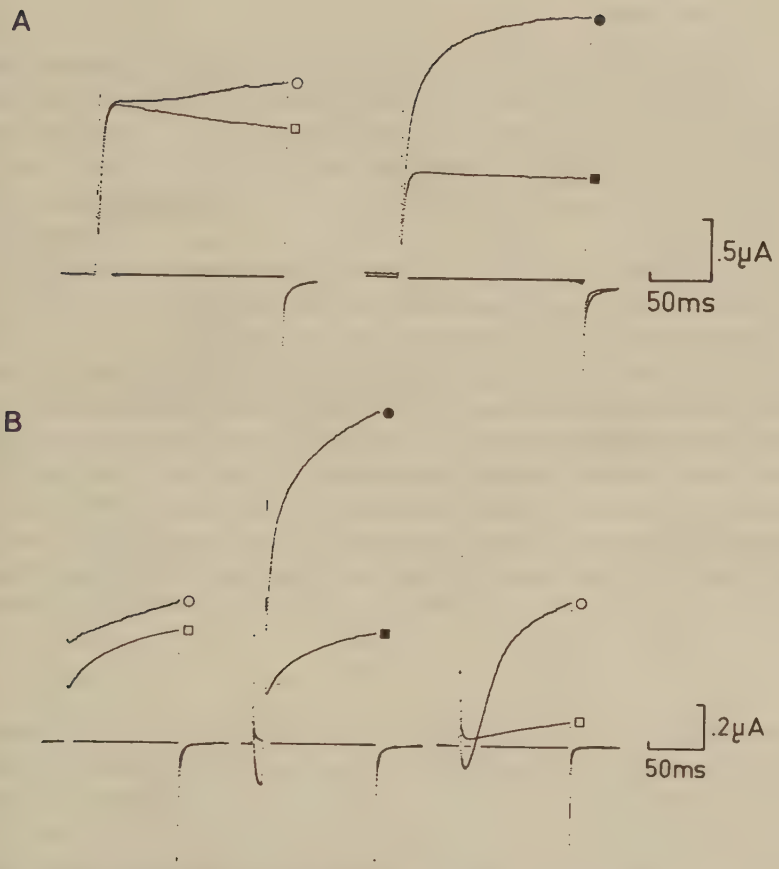


Abb. 4.5.12 Clampströme in 20 mM Ni^{2+}. (o,●) NR, (□,■) Ni^{2+}, (o,□) ohne Vorpuls, (●,■) mit Vorpuls. A: Zelle vom Typ M, Test-Depolarisation +130 mV, Vp 0 mV/500 ms. B: Zelle vom Typ C, links und Mitte: Test-Depolarisation +150 mV, Vp +20 mV; rechts: Test-Depolarisation +50 mV.

einen depolarisierenden Test-Vorpuls in eine Verkleinerung um, da die verbleibende, nur potentialabhängige Komponente durch den Vorpuls bereits teilweise inaktiviert ist. Die Reaktion dieser Membranen auf Ni-Ringer ist also ganz analog der auf Injektion des Komplexbildners EGTA (Abb. 4.5.12.B).

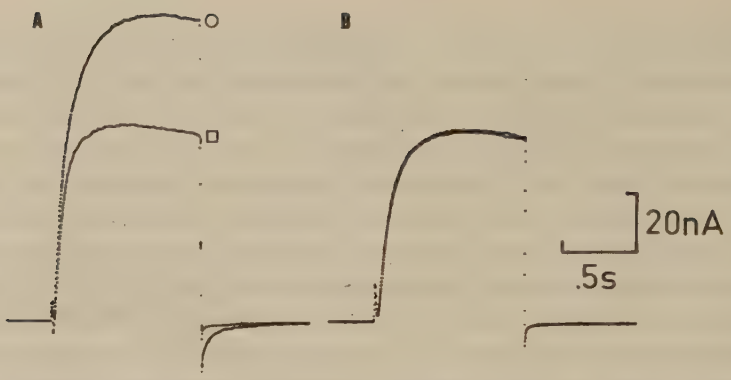


Abb. 4.5.13 Clampströme in 2o mM Ni^{2+} mit anschließender Injektion von EGTA bei Depolarisationen von +3o mV. A: (○) Kontrolle in NR, (□) in Ni^{2+}. B: In Ni^{2+}, je eine Spur vor und nach Injektion.

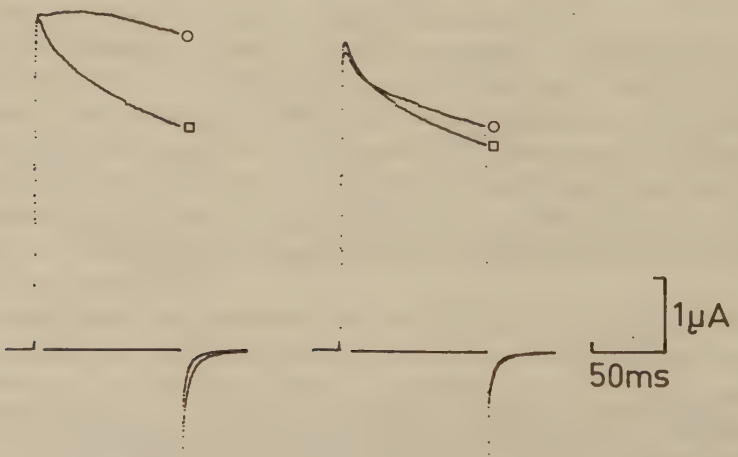


Abb. 4.5.14 Doppelpulse (tp=1 s) auf +11o mV. Kontrolle in NR (○), in Ni^{2+}(□).

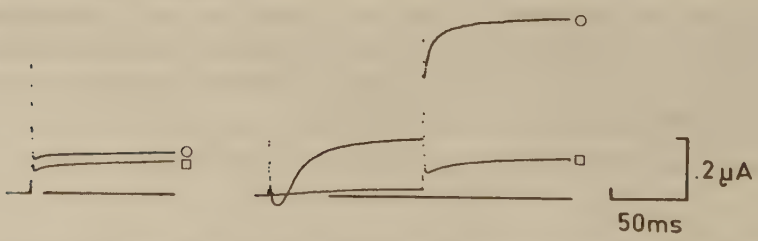


Abb. 4.5.15 Clampströme in 2o mM Mn^{2+} bei Depolarisationen auf +15o mV. (○) Kontrolle in NR, (□) in Mn^{2+}. Rechts mit Vp auf +3o mV.

Dies ließ sich auch noch auf andere Art nachweisen. Während Ni in Abb. 4.5.13 den Auswärts-Strom bei Depolarisationen im linearen Bereich der Strom-Spannungs-Kennlinie auf ca. 60% des Kontrollwerts reduziert, bringt eine darauf folgende Injektion von EGTA keine sichtbare Veränderung des Auswärts-Stroms mehr mit sich, d.h., beide Behandlungen wirken blockierend auf die gleiche Komponente des Auswärtsstroms.
Als letzter Befund der Wirkung von Ni-Ionen wird noch das Verhalten von Membranen des M-Typs bei Doppelpulsen gezeigt. Während auf Abb. 4.5.14 in Normalringer zwischen dem 1. und dem 2. Puls eine deutliche Stromverminderung, vornehmlich durch Depression der späten Komponente charakteristisch ist, ist in Ni der Unterschied zwischen den Strömen bei beiden Depolarisationen wesentlich geringer, und zwar dadurch, daß die der Depression unterworfene Komponente schon beim ersten Puls nicht aktiviert wird. Die restliche Verminderung des Auswärts-Stroms ist mit der langsamen Reaktivierung der nur potentialabhängigen Komponente hinreichend erklärbar. Die Wirkungen der Ni-Ionen waren in allen Fällen ausgezeichnet reversibel. Mangan wurde nur mit der Vorpuls-Methode untersucht. Abb. 4.5.15 zeigt, daß die Wirkung ebenso blockierend ist wie bei Kobalt oder Nickel.

4.5.4. Lanthan

Lanthan, das Ion mit der gleichen Elektronenhülle wie Barium, jedoch dreifach geladen, hat den Vorteil, daß es bereits in sehr geringen Konzentrationen wirkt und somit dem sonst völlig unveränderten Ringer einfach additiv zugefügt werden kann. Es wurden allgemein Konzentrationen von 1 mM/l $LaCl_2$ verwendet. Das La-Ion bindet an der Membran sehr fest, da seine Wirkungen auch nach Auswaschen mit Normalringer über Zeiten von bis zu einer Stunde nie reversibel waren.
Die Anwendung von La-Ringer auf Membranen des P-Typs zeigt erwartungsgemäß keinerlei wesentliche Effekte, sehr deutlich sind sie jedoch bei Anwendung auf eine Burster-Zelle (Typ M). Die Effekte in Abb. 4.5.16.B sind praktisch die gleichen wie bei Anwendung der anderen Blocker des Ca-Einstroms, der verbleibende Strom zeigt in den charakteristischen Parametern das gleiche Verhalten wie die Ströme der Membranen des P-Typs. Auch die Reaktion der Typ C Membranen entspricht der auf Nickel oder Kobalt, und der Block ist trotz der geringen Konzentration und der gleichzeitigen Anwesenheit von 10 mM/l $CaCl_2$ vollständig (Abb. 4.5.17).
Bezüglich der Einwärtsströme ist mittels La ein interessantes Ergebnis zu verzeichnen. Eine mit dem Komplexbildner Di-K-EDTA injizierte Bursterzelle in Abb. 4.5.18

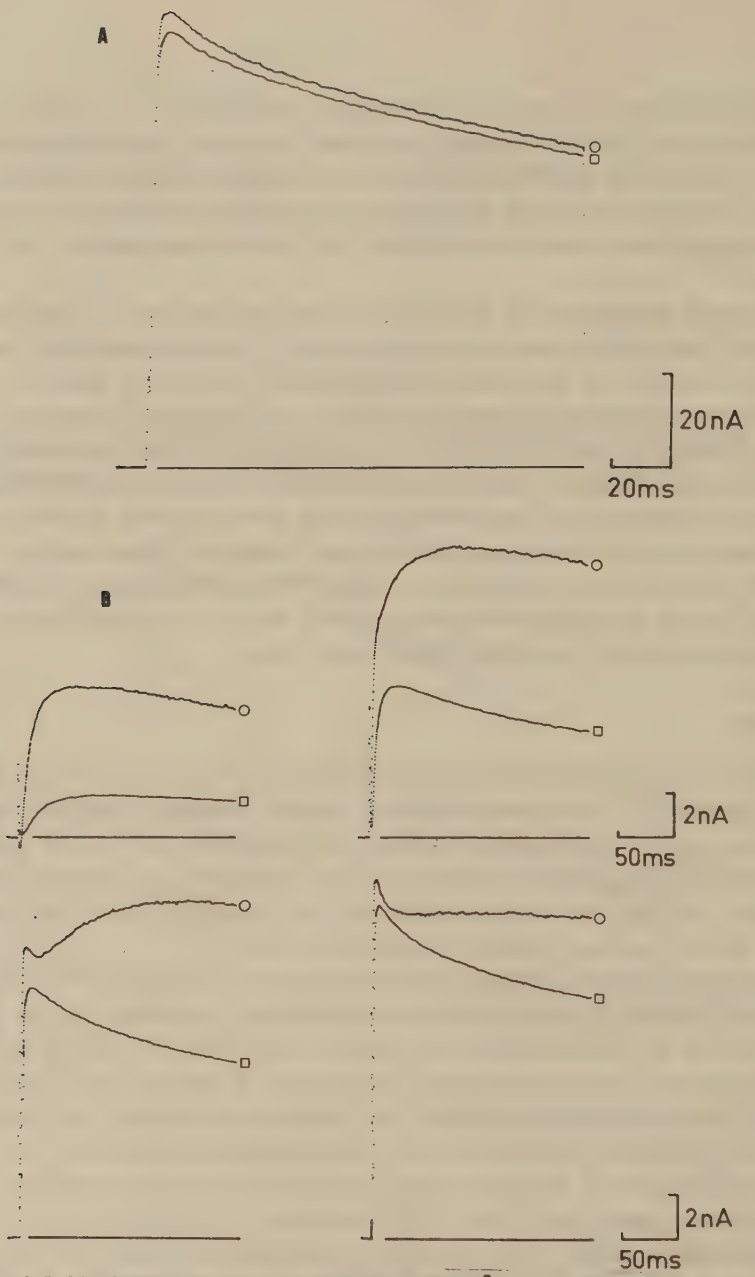


Abb. 4.5.16 Clampströme bei Zusatz von 1 mM La^{3+}. (○) Kontrolle in NR, (□) nach Zusatz von La^{3+}. A: Depolarisation einer Zelle des P-Typs auf +11o mV. B: Depolarisationen einer Burster-Zelle auf +3o, +7o, +11o und +15o mV.

zeigt bei repetitiver, mäßiger Depolarisation die in Kap. 4.4. schon beschriebene Inaktivierung. Es handelt sich dabei ganz überwiegend um die Stromkomponente P, die zusammen mit dem Einwärts-Strom den Verlauf bestimmt und, wie in Abb. 4.5.16.A gezeigt wurde, von La in Größe und Kinetik nicht wesentlich verändert wird. Die Differenz der Ströme in Normalringer und La ist daher als Einwärtsstrom zu interpretieren. Es ist sofort zu sehen, daß diese Differenz beim letzten Puls des Trains deutlich größer ist als beim ersten. Es dürfte dies ein weiterer Hinweis auf die schon erwähnte Fazilitierung des Ca-Einwärts-Stroms bei repetitiver Reizung sein (Heyer und Lux 1976a).

4.6. Injektion divalenter Kationen

Die intrazelluläre Injektion der divalenten Kationen ist in gewisser Weise der eindeutigste Weg, um deren Wirkungen an der Innenseite der Membran nachzuweisen. Das gilt vor allem für diejenigen Ionen, die nicht nennenswert die Membran als Einwärtsstrom passieren können, wie z.B. Co. Andererseits hat die Methode gegenüber den bisher geschilderten durchaus einige Nachteile. Die Injektion ist nämlich nur punktförmig und damit ist die Ionenkonzentration über der gesamten Oberfläche der Membran zunächst sicher nicht gleichförmig. Direkte Bestimmungen unter Verwendung des Photoproteins Aequorin zeigen starke lokale Unterschiede der Ca-Aktivität nach intrazellulärer Injektion (Rose und Loewenstein 1975,1976). Durch die notwendige Diffusion des injizierten Kalziums zu den entfernter liegenden Teilen der Membran sind dessen Wirkungen zeitlich nur begrenzt auflösbar. Da außerdem das gesamte Volumen der Zelle gefüllt werden muß, sind große Mengen erforderlich, die natürlich auch nur entsprechend langsam wieder resorbiert werden.
Man kann jedoch mit der Methode einen weiteren unabhängigen Hinweis auf die Wirkung der jeweiligen Kationen erhalten, wobei jede Möglichkeit der Beeinflussung durch Potentialeffekte, die bei der Vorpuls-Methode möglich sind, ausgeschlossen sind.
Es wurden die Erdalkali-Ionen Ca, Sr und Ba sowie Co injiziert. Die dazu verwendeten Zellen waren sämtlich Riesenzellen und daher vom M-Typ. Injektionen in die wesentlich kleineren Zellen der D-Gruppe (Sakharov und Salanki 1969) sind technisch sehr schwierig und wurden daher nicht weiter verfolgt.

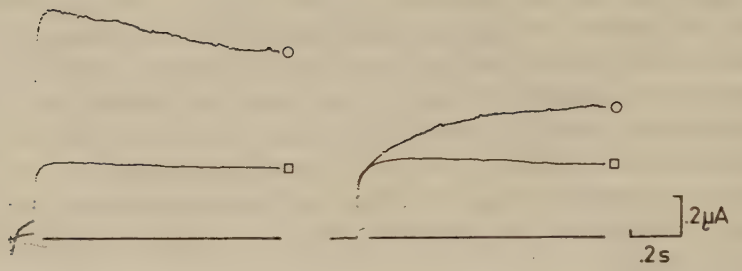
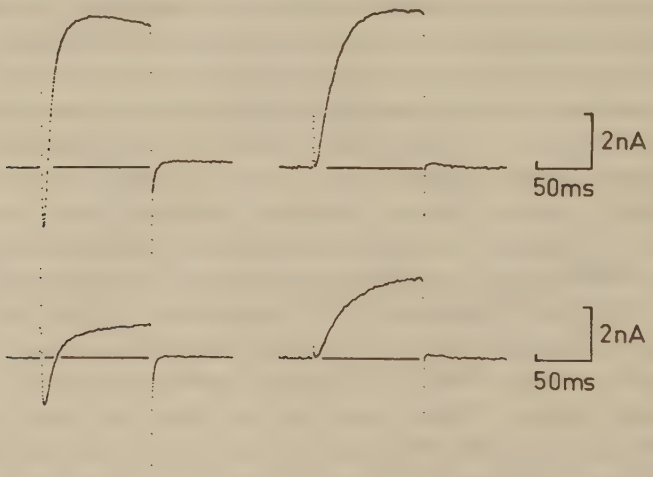


Abb. 4.5.17 Clampströme bei Zusatz von 1 mM La^{3+} bei einer Zelle des C-Tyns bei Depolarisationen auf +13o mV, links mit Vorpuls auf +1o mV. (○) Kontrolle in NR, (○) nach Zusatz von La^{3+}.



4.5.18 Repetitive (tp=3oo ms) Depolarisationen einer Burster-Zelle auf +3o mV, oben 1., unten 1o. Puls der Serien. Links Kontrolle in NR, rechts nach Zusatz von 1 mM La^{3+}.

4.5.1. Injektion von Ca-Ionen

Die im Voltage-Clamp gemessenen Ströme waren für sämtliche Potentiale (bis zu +140 mV) nach Injektion von Ca-Ionen kleiner als die Kontrollwerte. Während bei kleinen Depolarisationen bis auf etwa +30 mV nur dieser allgemeine Befund erhoben werden kann, lassen sich durch Vergleich des Zeitverlaufs der Auswärtsstrom-Trajektorien bei höheren Depolarisationen, der Strom-Spannungs-Kennlinien, der Reaktion auf kleine depolarisierende Vorpulse sowie des momentanen Widerstandes der Membran im aktivierten Zustand weitere Charakteristika dieser Stromverminderung angeben.

Abb. 4.6.1 zeigt ausführlich im Vergleich typische Clamp-Ströme, wie sie bei Injektion von $CaCl_2$ zu beobachten sind. Im Stromverlauf bei einem mäßig hohen Einzelpuls wird durch die Injektion primär die ausgeprägte späte Stromkomponente vermindert. Bei sehr hohen Pulsen, bei denen diese Komponente schon in der Kontrollspur unterdrückt ist, erweist sich auch die durch die Injektion bewirkte Depression als minimal bei praktisch identischer Kinetik des Stromverlaufs.

Beim Auftragen der isochronen Stromwerte in das Strom-Spannungs-Diagramm resultiert die Ca-Injektion in einer Verminderung bzw. Beseitigung der charakteristischen N-Form der Kennlinie, und zwar vor allem durch Depression des Maximums. Jenseits dieses Maximums ist die durch die Injektion bewirkte Veränderung sowohl prozentual als auch absolut geringer, jedoch war auch hier immer eine Verminderung feststellbar.

Die Depression durch injiziertes Kalzium betrifft selektiv die gleiche Stromkomponente, die bei sehr hohen Testdepolarisationen durch kleine depolarisierende Vorpulse stark vergrößert werden kann. Der Vergleich der beiden Spalten von Original-Stromkurven sowie der Strom-Spannungs-Diagramme in Abb. 4.6.1 zeigt, daß durch die Injektion die fazilitierende Wirkung der Vorpulse stark vermindert ist.

Durch zusätzliche kurze Testpulse während normaler Clamp-Depolarisation wurde die momentane Konduktivität der Membranen nach Injektion von Ca-Ionen getestet. Unter Berücksichtigung des Gleichgewichtspotentials des Auswärtsstroms ist der Quotient

$$Q = \frac{I_M \cdot (V_M + \Delta V - V_G)}{(I_M + \Delta I) \cdot (V_M - V_G)}$$

ein Maß für die Konduktivität der Membran. Dabei ist

I_M = Membranstrom vor dem Potentialsprung

ΔI = Stromdifferenz beim Potentialsprung

V_M = Membranpotential vor dem Potentialsprung

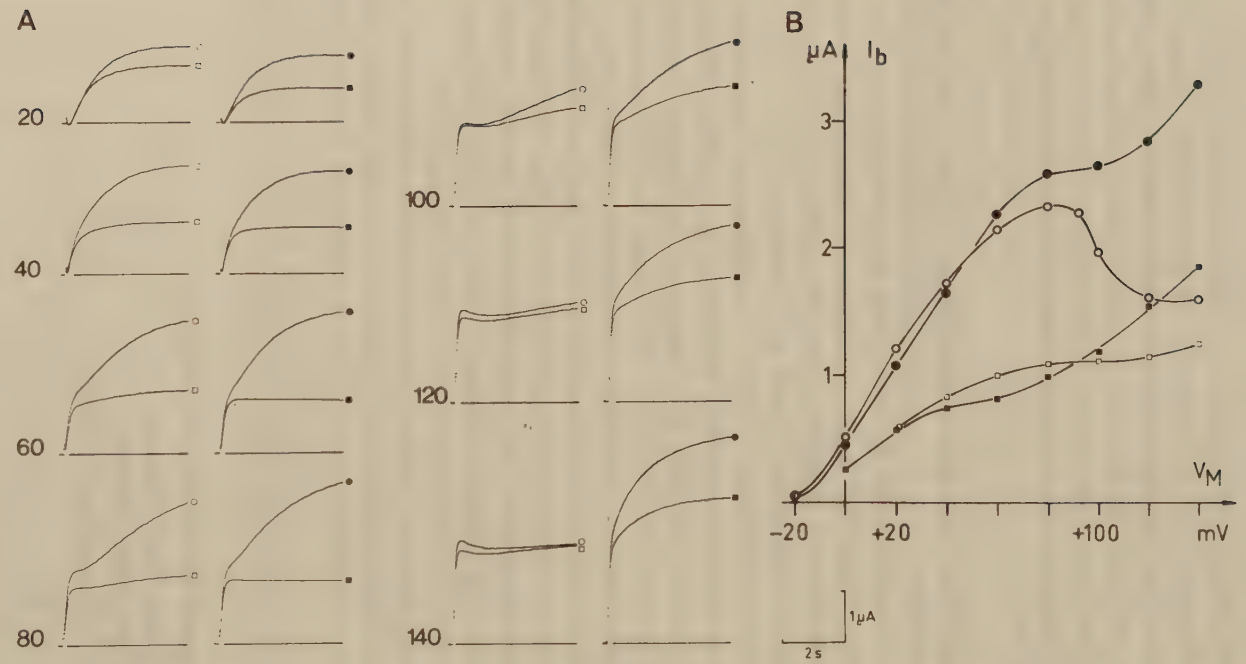


Abb. 4.6.1 A: Clampströme bei Depolarisation einer Burster-Zelle auf die jeweils neben den Strömen angegebenen Potentiale bei Injektion von $CaCl_2$. (○,●) Kontrolle; (□,■) nach Injektion; (○,□) ohne Vorpuls; (●,■) mit Vorpuls auf -2o mV/5oo ms; B: Isochrone (t=2oo ms) I-V-Kurven dazu.

ΔV = Höhe des Potentialsprungs
V_G = Gleichgewichtspotential des Auswärtsstroms
Abb. 4.6.2 zeigt, daß die in der Kontrolle nur schwach ausgeprägte Anomalie des Membran-Leitwerts bei höheren Potentialen nach der Injektion wesentlich verstärkt ist und auch schon früher einsetzt. Die bei Potentialen über +120 mV wieder anwachsenden Werte (siehe hierzu auch Kap. 4.3) bleiben dagegen im wesentlichen unverändert.

4.6.2. Injektionen von Sr- und Ba-Ionen

Injektionen von Sr-Ionen führen ebenso wie die Injektion von Ca-Ionen zu einer Verminderung der Auswärtsströme bei allen Potentialen, eine auffällige Veränderung der Kinetik der Ströme tritt jedoch nicht auf. Deutlich vermindert ist die Vergrößerung des Stroms bei hohen Testdepolarisationen nach einem Vorpuls, während der zu Beginn der Depolarisation auftretende Spitzenstrom unverändert ist (Abb. 4.6.3). In qualitativ gleicher Weise, jedoch quantitativ noch ausgeprägter gilt das gleiche auch für Injektionen von Ba-Ionen. Auch hier wird die vorher N-förmige Kennlinie begradigt bei gleichzeitiger sehr starker Depression der Auswärtsströme (Abb.4.6.4A). Dieser starke Effekt von Ba dürfte damit zusammenhängen, daß auch die P-Komponente durch die Ba-Ionen vermindert wird, wie in Abb. 4.6.4B durch die Verkleinerung der Ströme bei fortlaufender iontophoretischer Injektion von $BaCl_2$ in eine Zelle demonstriert wird, deren Ca-abhängiges System durch Co-Ringer blockiert wurde.

4.6.3. Injektionen von Co-Ionen

Während die bisher beschriebenen Erdalkali-Ionen bei entsprechender Badlösung alle die Membran auch als Einwärtsstrom passieren können, ist dies bei Co nicht der Fall. Co wurde als Vertreter der den Einwärtsstrom blockierenden divalenten Ionen auch intrazellulär appliziert. Die Effekte waren qualitativ sehr ähnlich denen der Erdalkali-Metalle. Der primäre Effekt bestand in einer Depression des Auswärtstroms, wobei in den Fällen, in denen zwei Komponenten unterscheidbar waren, jeweils vor allem die langsamere betroffen war. Jedoch war der spezifische Effekt auf die I-V-Kennlinien wesentlich weniger ausgeprägt als bei den Ionen der Erdalkali-Metalle, und keinesfalls etwa mit der Wirkung von Co-Ionen an der Außenseite der Membran zu vergleichen. Auch die fazilitierende Wirkung depolarisierender Vorpulse war zwar vermindert, jedoch nicht vollständig blockiert, wie aus dem in Abb. 4.6.5 gezeigten Experiment hervorgeht.

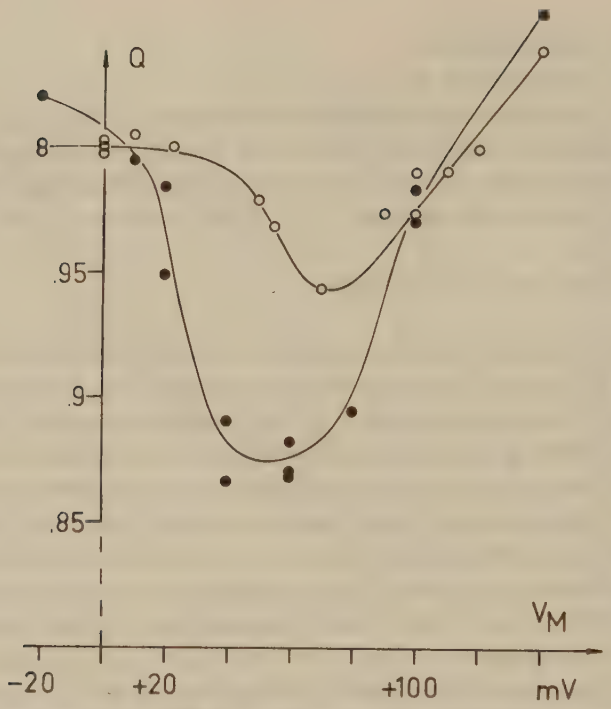


Abb. 4.6.2 Momentane Konduktivität vor (○) bzw. nach (●) Injektion von $CaCl_2$ in Abhängigkeit von der Amplitude der Depolarisation.

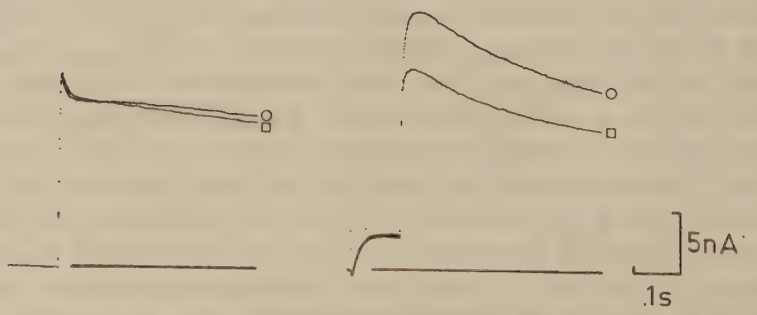


Abb. 4.6.3 Clampströme bei Depolarisationen auf +13o mV nach Injektion von $SrCl_2$ (□). Rechts mit Vorpuls auf +1o mV.

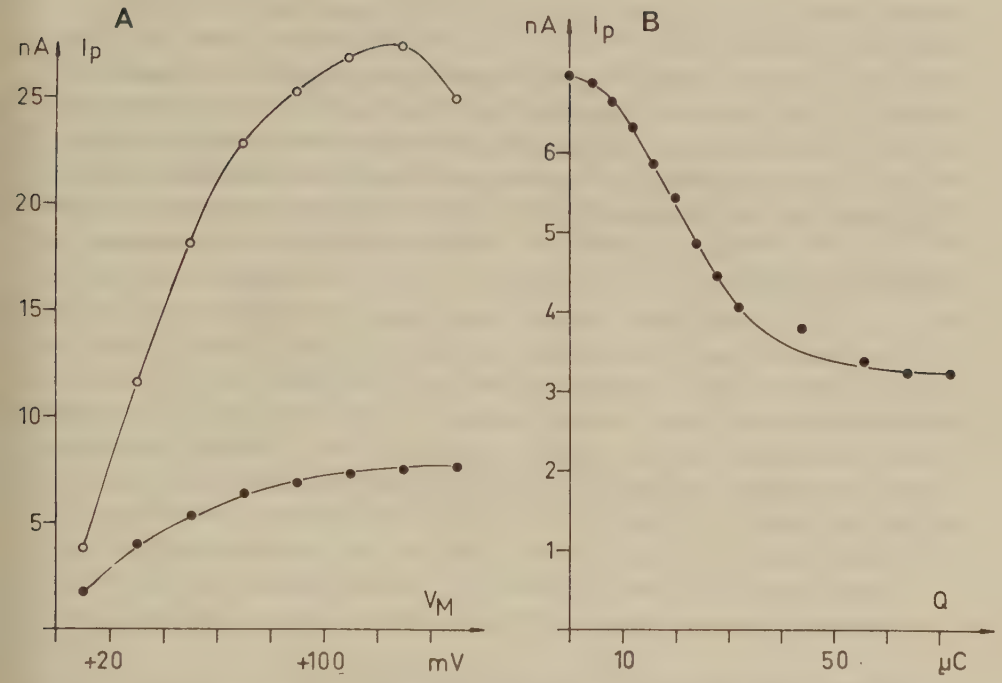


Abb. 4.6.4 A: Isochrone (t=100 ms) I-V-Kurven vor (○) bzw. nach (●) Injektion von $BaCl_2$. B: Abnahme des Spitzenstroms bei iontophoretischer Injektion von $BaCl_2$ nach Blockade Ca-abhängiger Ströme durch 20 mM Co^{2+}.

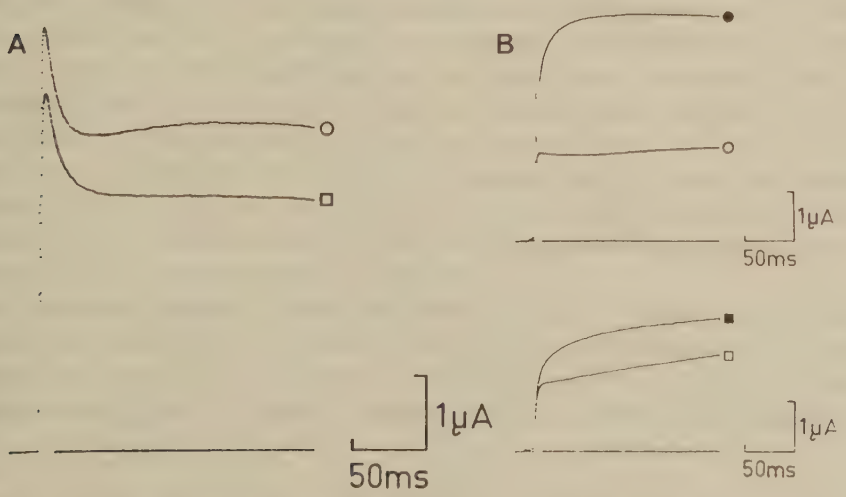


Abb. 4.6.5 Clampströme bei Injektion von $CoCl_2$, (○,●) vor bzw. (□,■) nach Injektion. A: Depolarisation auf +110 mV. B: Depolarisation auf +170 mV, Vorpuls auf +20 mV. (○,□) ohne Vp, (●,■) mit Vp.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß die aktivierende bzw. blockierende Wirkung der einzelnen divalenten Kationen auf den Auswärtsstrom an der Innenseite und an der Außenseite der Membran durchaus verschieden sein kann. Es scheint geradezu, daß das Ca-Ion, welches unter physiologischen Bedingungen als Bestandteil der Hämolymphe bzw. der Badflüssigkeit den Auswärtstrom maximal stimuliert, bei Injektion an der Innenseite auch einen maximalen depressiven Effekt hat, während das Co-Ion, das den gleichen Strom -an der Außenseite angewandt- praktisch vollständig unterdrückt, als injiziertes Ion nur vergleichsweise geringe und unspezifische Wirkung hat.

4.7. Injektion von TEA-Chlorid

Die Wirkung des Tetraaethylammonium-Ions (TEA) und anderer quarternärer Ammonium-Ionen auf erregbare Membranen wurde seit 1965 (Armstrong und Binstock) vielfach untersucht (Nakajima 1966, Koppenhöfer und Vogel 1969, Armstrong und Hille 1972). Das TEA-Ion blockiert an den verschiedenen Präparaten den Kalium-Strom, und zwar in unterschiedlichem Maße bei Einwirkung auf die Innenseite oder die Außenseite der Membran.

Für die Nervensomamembranen von Helix pomatia ergab sich, daß TEA im wesentlichen nur auf der Innenseite wirkt, wobei jedoch auch bei hohen Dosen stets nur ein Teil des Auswärts-Stroms blockierbar war (Neher und Lux 1972). Die geringere Empfindlichkeit des kurz zuvor entdeckten unterschwelligen Stroms (Connor und Stevens 1971, Neher und Lux 1971) wurde dort zur Unterscheidung der beiden damals bekannten Komponenten des Auswärtsstroms herangezogen. Später konnte noch nachgewiesen werden, daß der bei der Bursterzelle sehr beträchtliche verbleibende Auswärtsstrom nach TEA-Injektion von einer Aktivierung durch Kalzium abhängig ist (Heyer und Lux 1976). Es wurde daher untersucht, wie sich injiziertes TEA auf die charakteristischen Zeitverläufe des Auswärtsstroms bei den Zellen der Typen P und M sowie deren Reaktion auf kleine depolarisierende Vorpulse bei hohen Testdepolarisationen auswirkt.

Bei den Zellen des M-Typs ist eine starke Abnahme des Auswärtsstromes im Laufe der TEA-Injektionen zu beobachten, wobei gleichzeitig die Anstiegskinetik verlangsamt und die Inaktivierung während der Depolarisation vermindert wird (Abb. 4.7.1). Abb. 4.7.2 zeigt den Verlauf dieser Reduktion des Auswärtsstroms einer Zelle während einer längerdauernden iontophoretischen Injektion von TEA-Chlorid; bis zur Sättigung der blockierenden Wirkung sind dabei relativ große Mengen erforderlich. Eine Abschätzung der relativen Empfindlichkeit der Membranen bei TEA-Injektionen im Vergleich zu EGTA-Injektionen geben die Resultate von einigen Versuchen, bei denen in Zellen des M-Typs äquimolare (0.25 M/l) Lösungen von TEA-Chlorid und Di-K-EGTA druckinjiziert wurden. Die dabei auftretenden Effekte waren ausschließlich die von EGTA, d.h. zur Erzielung merklicher TEA-Effekte sind wesentlich größere Mengen erforderlich als dies bei EGTA der Fall ist.

Eine nahezu vollständige Blockade des Auswärtsstroms von Zellen des M-Typs läßt sich erzielen, wenn die aktivierende Wirkung des extrazellulären Kalzium durch Zugabe von 1 mM/l $LaCl_3$ zur Badlösung ausgeschaltet wird (Abb. 4.7.3; siehe auch Heyer und Lux 1976b). In normaler Ringerlösung ist die Wirkung von injiziertem

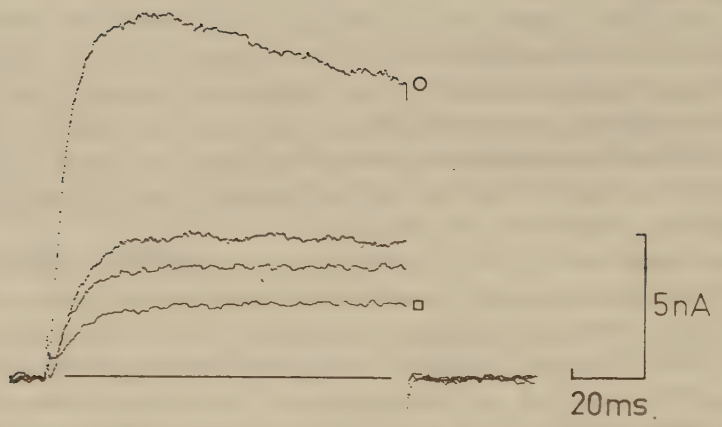


Abb. 4.7.1 Clampströme einer Zelle des P-Typs bei Depolarisationen auf +3o mV vor (○) und nach (□) mehrfacher iontophoretischer Injektion von TEA-Cl.

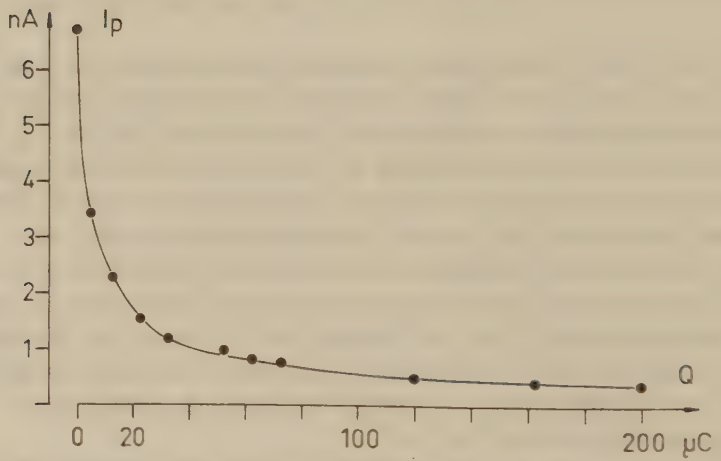


Abb. 4.7.2 Abnahme des Spitzenauswärtsstroms bei einer Depolarisation auf +3o mV einer Zelle des P-Typs in 1 mM La^{3+} bei fortlaufender iontophoretischer Injektion von TEA-Cl.

TEA dagegen wesentlich komplexer. Bei niedrigen Potentialen ergibt sich nur eine recht geringe Reduktion des Auswärtstroms, wobei wieder die Verlangsamung der Anstiegskinetik sowie die Verminderung der Inaktivierung auffällig sind (Abb. 4.7.4). Bei höheren Testdepolarisationen verschwindet die charakteristische schnelle Spitze des Auswärtsstroms, der zeitliche Verlauf der Stromtrajektorien ebenso wie die isochrone I-V-Kennlinie ähneln mehr denen der Membranen des C-Typs (Abb. 4.7.5). Vor allem aber wird die Differenz der Ströme mit und ohne kleinen depolarisierenden Vorpuls auffallend. Während z.B. bei der in Abb. 4.7.5 gezeigten Zelle vor der Injektion bis zu Potentialen von +9o mV die Folge eines solchen Vorpulses eine Verkleinerung des Auswärtsstroms und auch bei höheren Potentialen die Vergrößerung durch den Vorpuls nur gering war, setzte nach der Injektion die Vergrößerung schon bei Depolarisationen auf +7o mV ein und war sowohl relativ als auch absolut größer als vor der Injektion. Die Stromspuren dieser Abbildung zeigen Beispiele aus einem anderen Experiment, bei dem diese Umkehrung der Vorpuls-Wirkung, wenn auch auf drastisch vermindertem Niveau, besonders deutlich wird.

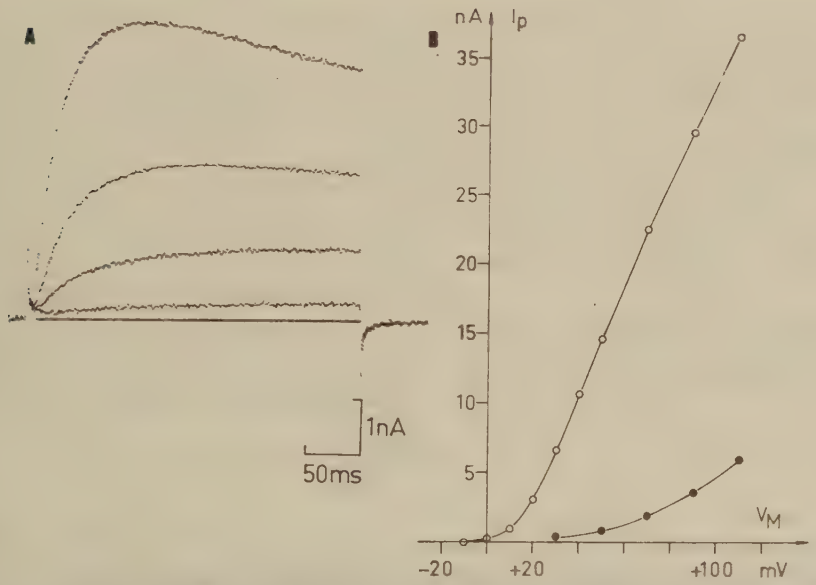


Abb. 4.7.3 A: Clampströme einer Zelle des M-Typs in 1 mM La^{3+} bei Depolarisation auf +3o mV und mehrfacher Injektion von TEA-Cl. B: I-V-Kurven der Spitzenströme zu A. (o) vor Injektion bzw. (●) nach letzter Injektion.

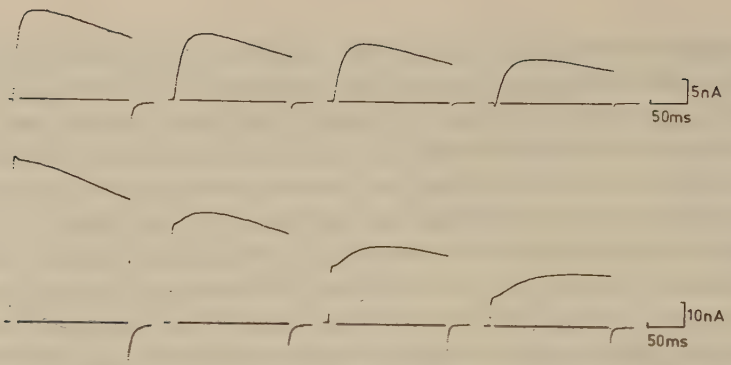


Abb. 4.7.4 Clampströme bei Depolarisationen auf +3o mV (obere Reihe) bzw. +11o mV und mehrfacher Druckinjektion von TEA-Cl. Innenkonzentration von TEA (von links) ca. o, 1, 2, 5 mM/l.

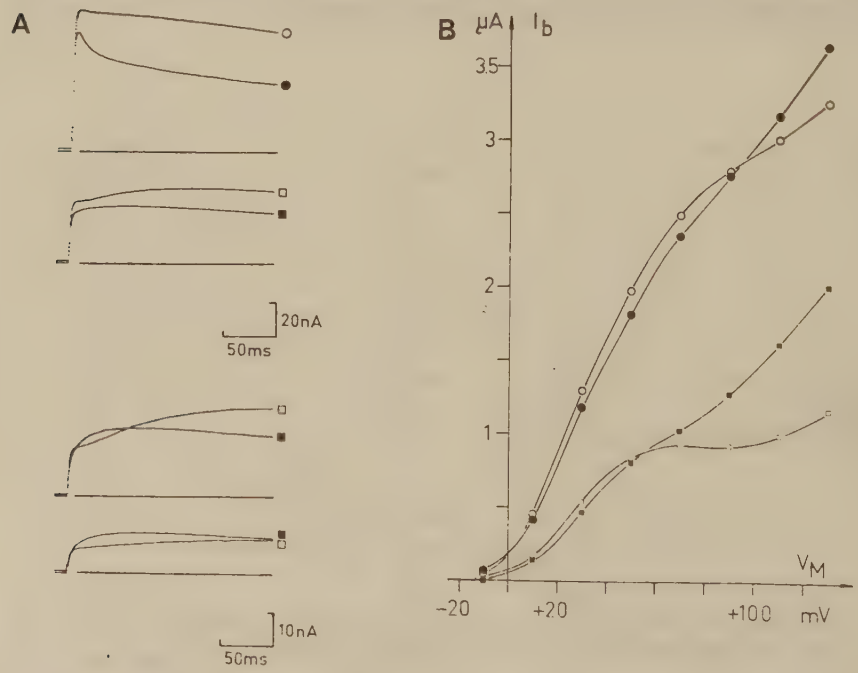


Abb. 4.7.5 Erhöhung der Effektivität von depolarisierenden Vorpulsen durch Injektion von TEA-Cl. (○,●) vor bzw. (□,■) nach Injektion; (○,□) ohne bzw. (●,■) mit Vorpuls. A: Depolarisation +11o mV, Vp o mV/5oo ms. Innere TEA-Konzentration (von oben) ca. o, 5, 12, 3o mM/l. B: Isochrone (t=6o ms) I-V-Kurven aus einem anderen Experiment. Vorpuls -2o mV/4oo ms.

4.8. Messungen bei veränderter Temperatur

Änderungen der Temperatur können generell auf zweierlei Weise die Ergebnisse von Strommessungen beeinflussen. Bei nur kurzzeitigen Abweichungen der Temperatur bei der Messung von der Referenztemperatur darf man annehmen, daß die intrazellulären Konzentrationen der beteiligten Ionen zunächst konstant bleiben. Änderungen in der Größe und der Kinetik der gemessenen Ströme reflektieren dann unmittelbar temperaturabhängige Eigenschaften der Membran. Daneben sind zur Aufrechterhaltung der Ionenkonzentrations-Gradienten über der Membran ständig aktive Transport-Vorgänge wirksam, die ihrerseits über die Temperatur beeinflußt werden, wobei generell zu sagen ist, daß die Aktivität dieser Pumpen mit der Temperatur abnimmt. Ein längeres Verweilen bei geänderter Temperatur kann also mit der Zeit auch zu neuen Konzentrationsverhältnissen führen, deren Auswirkungen sich bei der Strommessung den direkten Temperatureffekten überlagern. In den Experimenten wurden beide Aspekte der Temperaturabhängigkeit berücksichtigt.

4.8.1. Unmittelbar temperaturabhängige Parameter

Durch Ausmessen der bei rechteckförmigen Depolarisationen im Voltage-Clamp fließenden Membranströme bei verschiedenen Temperaturen erhält man die Temperaturabhängigkeit sowohl der Amplitude der Nettoströme als auch der Geschwindigkeit ihres potentialabhängigen An- und Abschaltens. Gemäß der heute allgemein akzeptierten Vorstellung findet der Ionentransport durch spezielle 'Kanäle' in der Membran statt (Hille 197o), die im einfachsten Fall nur zwei mögliche Zustände aufweisen, nämlich 'offen' oder 'geschlossen'. Alle geöffneten Kanäle weisen eine einheitliche Konduktivität auf, die -abhängig von der Art des Ionen-Transportmechanismus im Kanal- einen Temperaturkoeffizienten (Q_{1o}) aufweist.
Die Zahl der geöffneten Kanäle ergibt sich aus den potentialabhängigen Werten der beiden Ratenkonstanten k_{AZ} und k_{ZA}, die die Obergänge zwischen den beiden Zuständen des Kanals bestimmen, gemäß der Reaktion

$$A \underset{k_{ZA}}{\overset{k_{AZ}}{\rightleftharpoons}} Z$$

Beide Parameter sind wiederum temperaturabhängig. Nimmt man in erster Näherung das Verhältnis beider Ratenkonstanten als temperaturunabhängig an, so ist der Gleichgewichtswert der bei einem bestimmten Potential geöffneten Kanäle konstant,

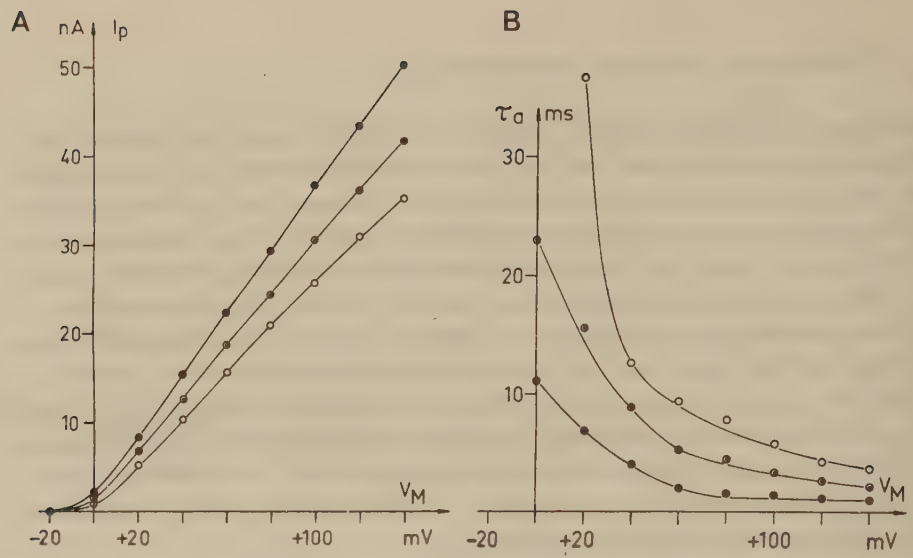


Abb. 4.8.1 Verlauf der Spitzenauswärtsströme (A) sowie der Aktivierungszeitkonstanten (B) einer Zelle des P-Typs bei verschiedenen Temperaturen: (○) 5 °C, (⊙) 1o °C, (●) 2o °C.

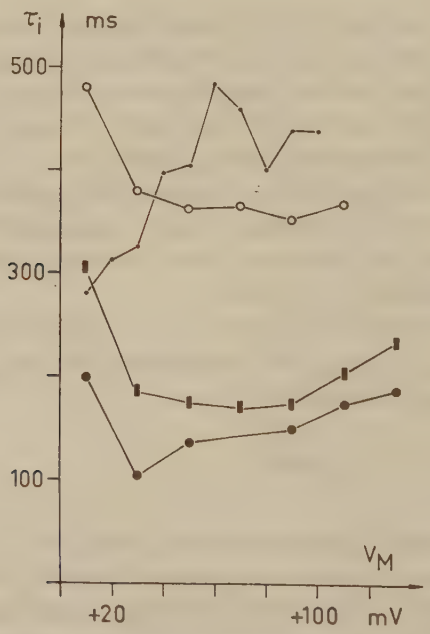


Abb. 4.8.2 Verlauf der Inaktivierungszeitkonstanten bei vier Zellen des P-Typs. Alle Messungen bei 2o °C.

und der Temperaturkoeffizient der Konduktivität des Einzelkanals ergibt sich direkt aus dem des gemessenen Stroms.
Bei momentaner Veränderung der potentialabhängigen Ratenkonstanten durch eine sprunghafte Depolarisation der Membran relaxiert das System zum neuen Gleichgewichtswert mit einer einfachen Zeitkonstante

$$\tau = \frac{1}{k_{AZ}+k_{ZA}} .$$

Da bei konstantem Membranpotential, während der Depolarisation, der Membranstrom der Zahl der geöffneten Kanäle (A) direkt proportional ist, ergibt sich der Temperaturkoeffizient der beiden Ratenkonstanten (wiederum in der schon erwähnten Näherung) als identisch mit dem der Aktivierungs-Zeitkonstante des Membranstroms. Er kann zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der Reaktion dienen, doch wie die Ergebnisse zeigen, scheint deren Wert nicht spezifisch für die einzelnen Membrantypen zu sein.
Die am besten dem besprochenen einfachen Modell entsprechenden Temperaturkoeffizienten ergaben sich bei der Untersuchung der Membranen des P-Typs sowie der entsprechenden Stromkomponente des M-Typs, wenn deren Anteil am Gesamtstrom durch eine der bereits beschriebenen Methoden betont wird. Abb. 4.8.1 zeigt den Verlauf der Auswärtsströme sowie der Aktivierungszeitkonstanten bei einer solchen Zelle des P-Typs bei Temperaturen von 5 °C bis 2o °C. Die Stromgröße ist monoton von der Temperatur abhängig, der aus 25 Einzelmessungnen gemittelte Q_{1o} beträgt 1.27 (± o.o5 S.D.). Dieser Wert entspricht dem von 1.27 für die Diffusionsgeschwindigkeit starker Elektrolyte sowie denen von 1.22 bis 1.24 für die Konduktivität wässriger Lösungen von KCl (Bělehrádek 1935). Die Aktivierungszeitkonstanten, die wie alle weiteren solchen Werte nach der in 3.7 beschriebenen Methode ermittelt wurden, zeigen einen Verlauf mit Verkürzung bei steigender Depolarisation sowie höherer Temperatur. Der mittlere Q_{1o} dieser Aktivierungszeitkonstanten beträgt o.41 (± o.o6 S.D.).
Weiter wurde noch unter verschiedenen Bedingungen die Zeitkonstante der Inaktivierung ermittelt, d.h. der Verkleinerung des Auswärtsstroms im Verlauf einer längeren Depolarisation. Diese Inaktivierung, die nicht mehr im Bilde einer einfachen Reaktion $A \rightleftharpoons Z$ zu beschreiben ist, wurde zwar nicht im Detail untersucht, stellt jedoch ein sehr interessantes Charakteristikum der besprochenen Stromkomponente dar. Die sich ergebenden Werte zwischen 15o ms und 5oo ms für verschiedene Zellen sind nämlich ganz offensichtlich nicht in ähnlich einfacher Weise vom Membranpotential abhängig wie etwa der Parameter τ_A. Abb. 4.8.2 gibt einen Oberblick der jeweils bei einer Temperatur von 2o °C ermittelten Werte.
Bei der Beschreibung der Stromtrajektorien der Membranen des M-Typs wurde bereits

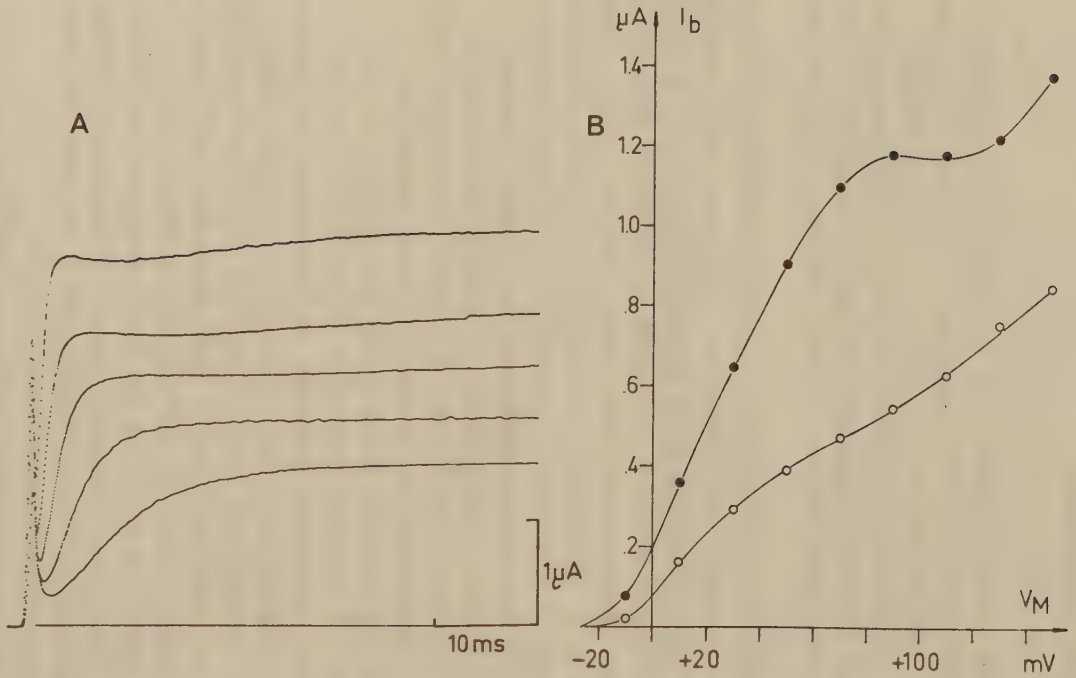


Abb. 4.8.3 Clampströme einer Zelle des M-Typs bei Depolarisationen auf +15o mV bei Temperaturen von 5 °C bis 25 °C um jeweils 5 K ansteigend. B: Isochrone (t=1oo ms) I-V-Kurven einer ähnlichen Zelle bei 5 °C (o) bzw. 15 °C.

darauf hingewiesen, daß die unmittelbar sichtbare Aufspaltung der Auswärtsströme dieser Membranen erst bei höheren Potentialen auftritt, während bei kleinen Depolarisationen die Aktivierungszeitkonstanten beider Komponenten offensichtlich nicht wesentlich verschieden sind.
Ähnliches gilt auch bezüglich der Temperatur, indem die ausgeprägte Verschiedenheit der beiden Komponenten mit niedrigerer Temperatur abnimmt, wobei gleichzeitig die I-V-Relation mehr den für Membranen des P-Typs typischen Verlauf annimmt. Die in Abb. 4.8.3 gezeigten Daten sind Beispiele hierfür. Auch bei Depolarisationen auf +15o mV ist aus den Verlauf der Spuren bei 5 ^{o}C und 1o ^{o}C die gleichzeitige Existenz zweier Komponenten nicht mehr unmittelbar zu erkennen. Diese Veränderungen im Zeitverlauf des Auswärtsstroms waren momentan reversibel, d.h. innerhalb der durch die Apparatur gegebenen Zeit zur Wiedererwärmung von wenigen Sekunden.
Eine ebensolche Temperaturabhängigkeit zeigt auch die Reaktion auf kleine depolarisierende Vorpulse. Die Wirkung dieser Vorpulse nimmt insbesondere bei Temperaturen unter 1o ^{o}C stark ab. Abb. 4.8.4 zeigt, daß der Strom bei 5 ^{o}C durch den Vorpuls

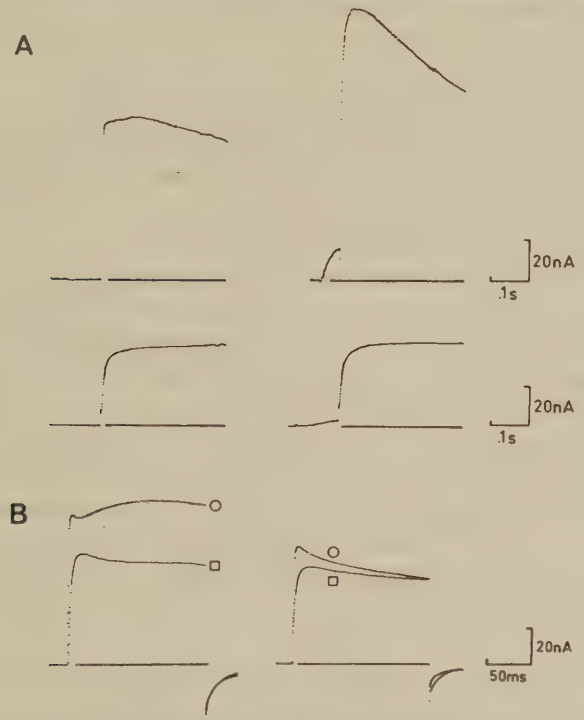


Abb.4.8.4 A: Wirkung von Vorpulsen auf o mV bei 2o ^{o}C (oben) und 5 ^{o}C. Testpotential +13o mV. B: Doppelpulse (t_p = 1s) auf +11o mV bei 2o ^{o}C (○) und 1o ^{o}C (□).

praktisch unverändert ist, während er bei 2o °C dadurch fast verdoppelt wird. Die durch Vorpulse bei hohen Depolarisationen fazilitierbare Komponente scheint also in solchen Fällen bei tiefen Temperaturen weitgehend unaktivierbar zu sein. Vergleichbar damit ist auch die schon besprochene Formveränderung des Auswärtsstroms bei einer Folge von depolarisierenden Pulsen. Während bei 2o °C im Laufe des Trains vor allem eine drastische Unterdrückung der späten Komponente erkennbar wird, ist bei 1o °C keine Depression auffällig, und zwar erscheint diese Komponente von vornherein nicht aktivierbar zu sein. Ein Vergleich mit dem Aussehen der Stromtrajektorien der gleichen Zelle nach Injektion von EGTA zeigt, daß es eben die gleiche Stromkomponente ist, die sowohl von der Kühlung wie auch von der EGTA-Injektion betroffen ist (vgl. dazu Abb. 4.4.7).

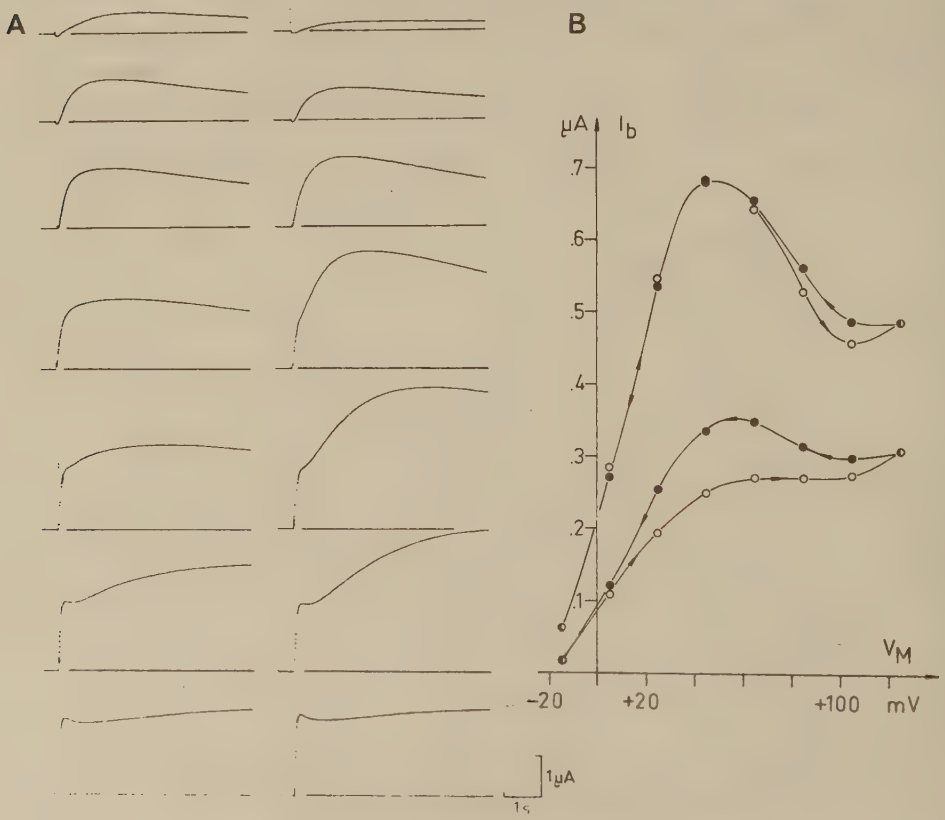


Abb. 4.8.5 Hystereseeffekt bei Pulsserien mit 3o s Pause zur Aufnahme von I-V-Kurven. A: Links Serie mit von +1o mV in Schritten von 2o mV zunehmender Depolarisation, rechts unmittelbar darauf aufgenommene Serie mit abnehmender Depolarisation. Temperatur 1o °C. B: Isochrone (t=1oo ms) I-V-Kurven einer anderen Zelle bei 25 °C und 1o °C. Die Richtung der Potentialänderung ist durch Pfeile angedeutet.

Eine damit zusammenhängende Beobachtung, die leicht zur Quelle einer irrtümlichen Interpretation von Ergebnissen werden kann, sei hier noch erwähnt. Zur Aufnahme der I-V-Kurven wurden die Membranen dabei so depolarisiert, daß zwischen zwei Pulsen jeweils eine Pause von 3o s lag, die i.A. als ausreichend erachtet wird, um jeweils wieder einen konstanten Ausgangszustand zu erreichen. Die beiden daraus resultierenden unterschiedlichen Scharen von Stromverläufen der Abb. 4.8.5 wurden so gewonnen, daß im einen Fall das Potential der Depolarisation alle 3o s ausgehend vom Ruhepotential um 2o mV erhöht wurde, im anderen ausgehend von +13o mV um jeweils 2o mV vermindert wurde. Die Differenz der Ströme bei gleichen Depolarisationen beträgt bis zu 7o %. Die I-V-Kurve der anderen Zelle zeigt für die gleichen Bedingungen je nach der Richtung der Potentialänderung in der Meßreihe bei 1o ^{o}C entweder N-Form oder Monotonie, während bei 25 ^{o}C die Abweichungen nur noch äußerst gering sind.

Bei den Membranen der Zellen der D-Gruppe ergibt die Bestimmung der Anstiegszeitkonstanten in Abhängigkeit vom Potential ein recht paradoxes Ergebnis, welches allerdings schon bei äußerlicher Betrachtung der Stromkurven klar sein muß. Im Gegensatz zu den Strömen der Membranen des P-Typs, ebenso wie zu sämtlichen bisher bekannten durch Depolarisation aktivierten Membranströmen in einer Vielzahl von Präparationen, nimmt hier die Aktivierungszeitkonstante mit der Depolarisation noch zu. Der nahezu gestreckte, rampenförmige Verlauf des Auswärtsstroms in einigen Fällen läßt sogar darauf schließen, daß sie schließlich gegen ∞ strebt. Außerdem ist in allen Fällen der Verlauf des Stroms nur sehr schlecht durch eine einfache exponentielle Funktion anzunähern. Es stört dabei vor allem das nach der anfänglichen starken Aktivierung des Stroms noch merkliche Anwachsen bei sehr langen Pulsen (vgl. Abb. 4.1.4). Wesentlich leichter erfaßbar wird das Bild, wenn alle Anstiege nach einem kleinen depolarisierenden Vorpuls gemessen werden, der die I-V-Beziehung von der vorher stark ausgeprägten N-Form nahezu in eine Gerade überführt. Das jetzt zu messende τ_A ist praktisch für alle Potentiale konstant, was auch aus den zugehörigen Stromkurven direkt hervorgeht. Obwohl die Anpassung an eine rein exponentielle Funktion weiterhin recht schlecht ist, bleibt als signifikantes Kennzeichen dieser Membranen die Unabhängigkeit der Aktivierungszeitkonstanten bei monotoner I-V-Charakteristik.

Die Temperaturabhängigkeit der Aktivierung ist mit einem Q_{10} von o.41 (± o.12 S.D.) als Mittel von drei Zellen bei Temperaturen zwischen 5 ^{o}C und 25 ^{o}C im Rahmen des Üblichen.

Im Gegensatz zu den Zellen des P-Typs zeigt der Q_{10} der Stromamplituden im Bereich

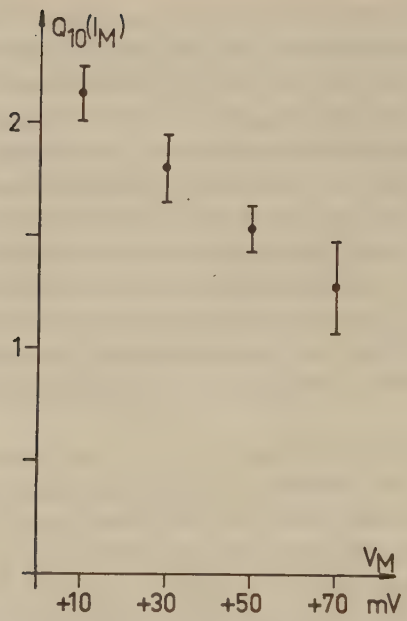


Abb. 4.8.6 Q_{10} der maximalen Auswärtsströme einer Zelle des C-Typs in Abhängigkeit von der Amplitude der Depolarisation. Jeder Einzelwert ist das Mittel aus 7 Messungen bei drei verschiedenen Temperaturen (5, 15, 25 °C).

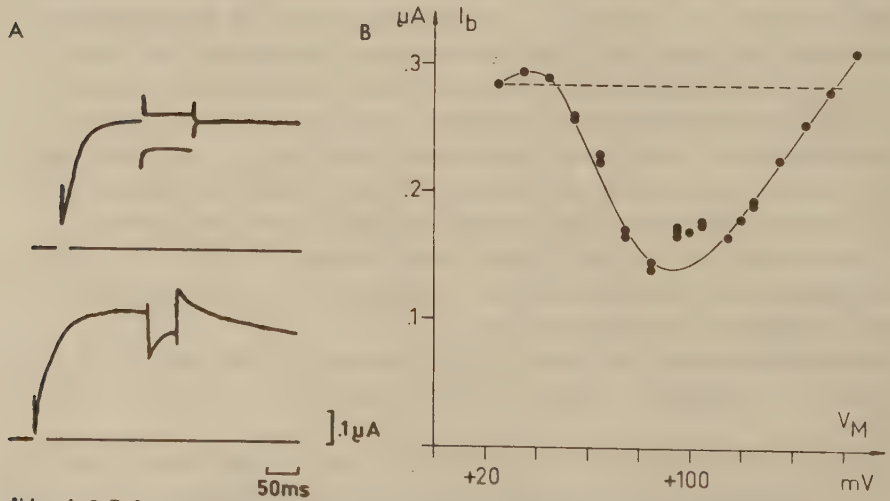


Abb. 4.8.7 A: Momentane Gleichrichtung (oben) bzw. momentaner negativer Widerstand bei konstant auf 12 °C gehaltenen Präparaten. Potential: +3o +/-4o mV; unten: +2o +4o mV; B: Verlauf des momentanen Clampstroms bei zunehmender Depolarisation auf eine Grunddepolarisation von +25 mV. Temperatur 5 °C.

zwischen +1o mV und +7o mV eine charakteristische Potentialabhängigkeit, die in Abb. 4.8.6 dargestellt ist. Eine naheliegende Erklärung bietet die Beobachtung, daß der in diesen Zellen bei hohen Depolarisationen besonders prononciert auftretende Leckstrom (extrapoliert auf den Zeitpunkt t=o) einen Wert von Q_{1o} = 1.24 (± o.o2 S.D.) aufweist, der nahe bei dem für einfache Diffusion gültigen von 1.27 liegt. Bereits kurz vor dem Maximum der I-V-Kennlinie dieser Zellen vermindert sich der relative Anteil des spezifisch aktivierten Stroms am Gesamtstrom , da er immer langsamer und in geringerem Maße aktiviert wird (fallender Ast der Kennlinie), während der Leckstrom weiter ansteigt. Nur bei niedrigen Potentialen wird also der Q_{1o} der eigentlichen C-Komponente gemessen. Der dort gültige Wert von 2.13 liegt signifikant höher als der der P-Komponente.

4.8.2. Messungen an gekühlten Präparaten

Hält man die Ganglien längere Zeit bei niedrigen Temperaturen, so werden die biochemischen Reaktionen, die im aktiven Tier die Ionenkonzentrationsgradienten aufrecherhalten, sehr stark gehemmt, und passive Ausgleichsvorgänge führen im Austausch gegen K zur Akkumulation von Na und Ca in der Zelle. Am ausgeprägtesten erhält man diesen Zustand, wenn ein am Vorabend des Experiments präpariertes Ganglion über Nacht im Kühlschrank bei 5 ^{o}C aufbewahrt und im Experiment bis zur Messung nicht wieder aufgewärmt wird. Wenn solche Ganglien nach Entnahme aus dem Kühlschrank während der Präparation für etwa eine Stunde wieder Raumtemperatur angenommen hatten, so verhielten sie sich im Experiment nicht anders als völlig frisch aus aktiven Schnecken präparierte. Dies beweist, daß während der Kühlung keine irreversiblen Schäden eintreten.
Ohne zwischenzeitliche Erwärmung jedoch zeigen die I-V-Kennlinien der meisten Zellen wiederum eine N-förmige Charakteristik, die jedoch in wesentlichen Punkten von den bisher beschriebenen Beobachtungen abweicht. Vor allem läßt sich die Kennlinie nicht durch einen kleinen depolarisierenden Vorpuls linearisieren, d.h. der Strom ist stets nur vom momentanen Potential abhängig. Dadurch können die Membranen einen negativen differentiellen Widerstand aufweisen, wenn in einer zweistufigen Depolarisation das Potential sprunghaft in das Gebiet des fallenden Astes der Kennlinie verlagert wird. In weniger ausgeprägten Fällen ist eine momentane Gleichrichtung zu beobachten. Abb. 4.8.7 zeigt dafür Beispiele sowie im Diagramm die typische Abhängigkeit des Stroms von der Höhe der zusätzlichen Depolarisation nach einer konstanten Depolarisation auf +25 mV. Die Zunahme des Stroms oberhalb des Minimums bei +1oo mV ist auf die Vergrößerung der zeitunabhängigen

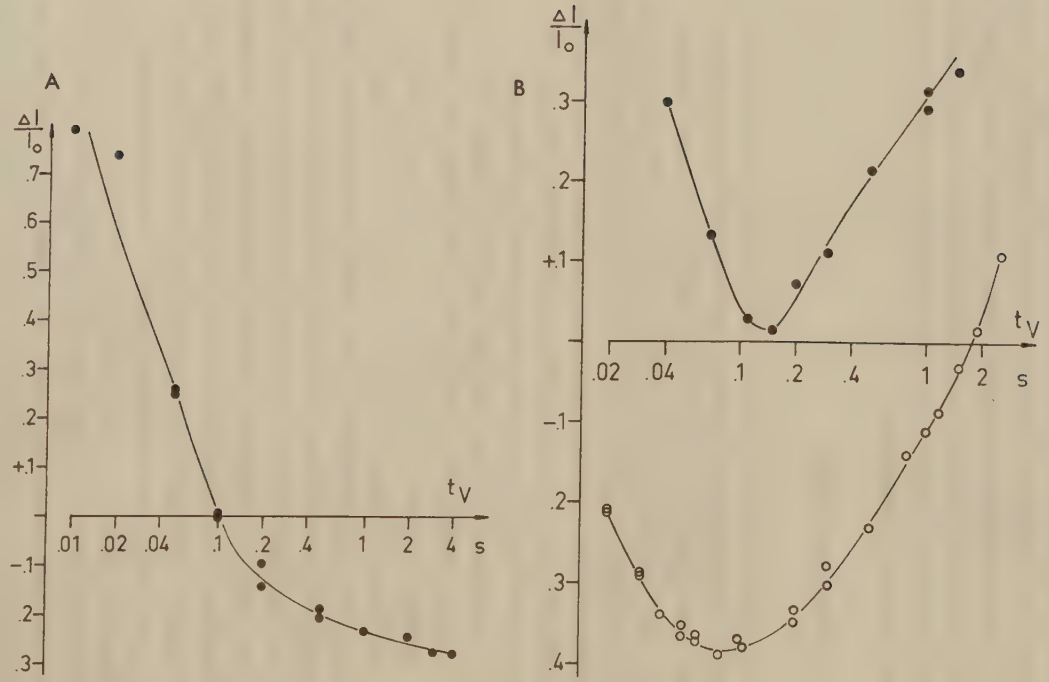


Abb. 4.8.8 Normierte Größe des Stromsprungs bei einem Potentialsprung von +5o mV in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand der Zusatzdepolarisation zum Beginn der Grunddepolarisation. A: Grunddepolarisation +8o mV. B: Grunddepolarisation +5o mV (○) bzw. +6o (●).

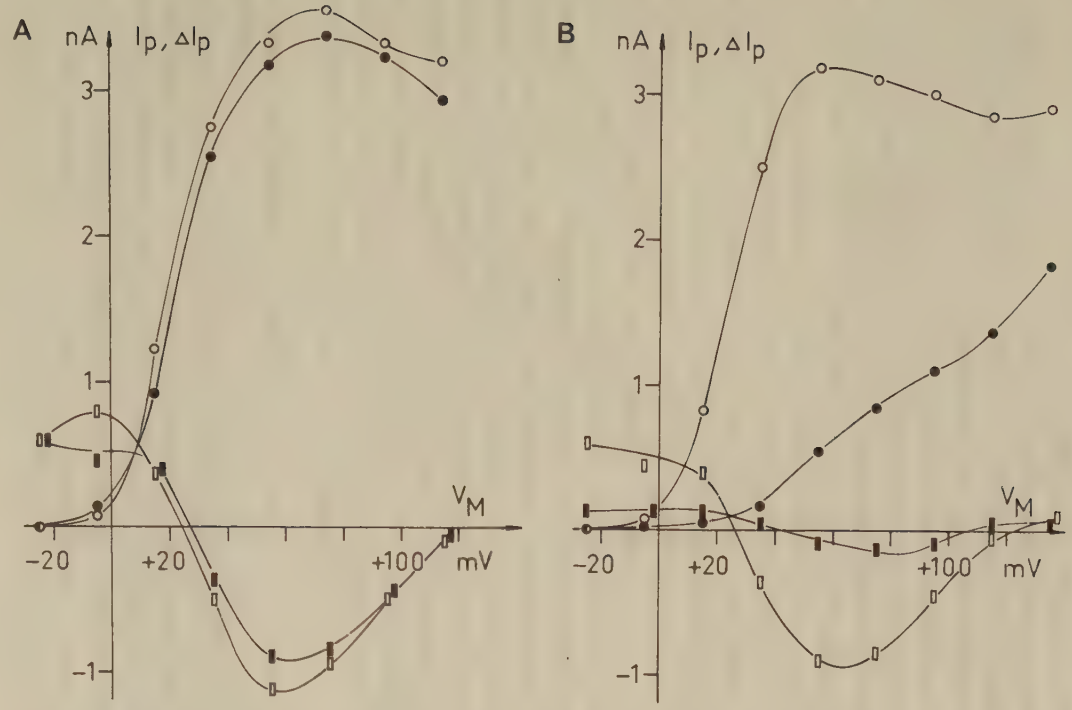


Abb. 4.8.9 Isochrone (t=100 ms) I-V-Kurven einer Zelle bei 5 °C. A: In NR (○) bzw. in Ca-freiem Ringer mit 20 mM Co^{2+} (●). (□, ■) Stromsprünge bei einer zusätzlichen Depolarisation von +50 mV jeweils 100 ms nach Beginn der Grunddepolarisation. B: Vor (○, □) bzw. nach (●, ■) der Injektion von TEA-Cl.

'Leck'-Komponente zurückzuführen. Der differentielle Widerstand, ausgedrückt durch Polarität und Größe des Stromsprungs beim zusätzlichen Testpuls konstanter Amplitude, zeigt eine ausgeprägte Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Tests relativ zum Beginn der ebenfalls konstanten Grunddepolarisation. Wie Abb. 4.8.8 zeigt, kann diese entweder monoton oder biphasisch sein, je nach dem Grad der Inaktivierung des Auswärtsstroms im Verlaufe der Grunddepolarisation.
Ebenso wie die Auswärtsströme der Membranen in diesem Zustand ist auch der differentielle Widerstand nicht von externen Ca-Ionen in der Badlösung abhängig, beide Größen reagieren jedoch auf die Injektion von TEA-Ionen (Abb. 4.8.9). Eine ähnliche Wirkung kann auch die Injektion von EGTA haben, die stets im Sinne einer Linearisierung der Kennlinie wirkt, wobei die Verminderung des Auswärtsstroms je nach Zelltyp verschieden stark ausgeprägt sein kann. Abb. 4.8.1o zeigt dafür Beispiele.

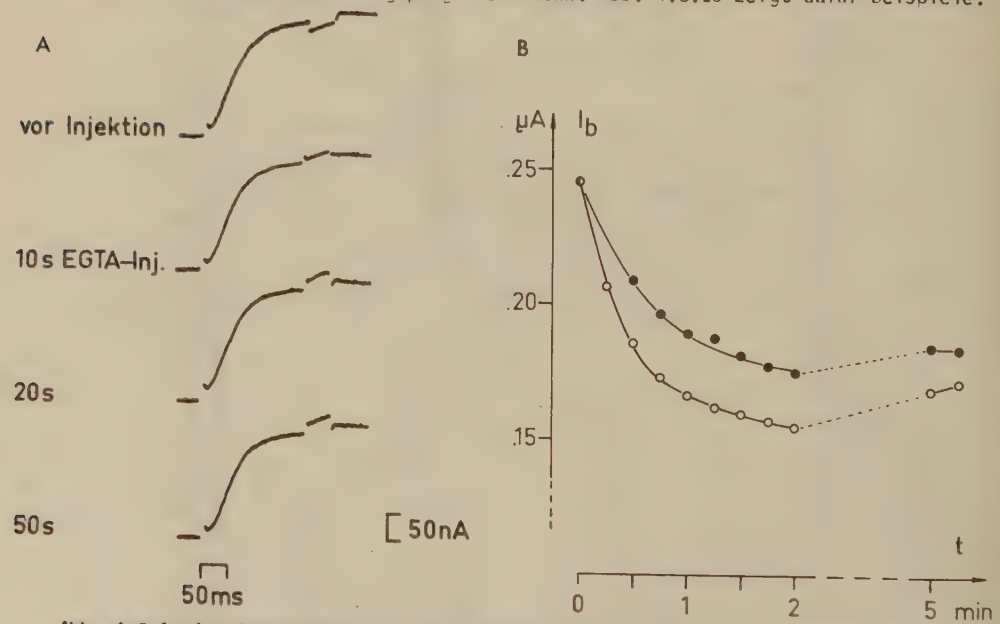


Abb. 4.8.1o A: Clampströme bei einer Depolarisation auf +5o mV mit Zusatzdepolarisation um weitere 4o mV mit negativem momentanem Widerstand zu verschiedenen Zeiten nach einer Druckinjektion von EGTA. Temperatur 12 oC. B: Verlauf des Clampstroms bei einer Grunddepolarisation auf +7o mV (○) sowie bei einer Zusatzdepolarisation um weitere 3o mV (●) im zeitlichen Verlauf nach einer Injektion von EGTA, die wenige Sekunden nach der Kontrollmessung bei t=o vorgenommen wurde.

5. Diskussion

5.1. Eigenschaften der drei Zelltypen

Die offensichtlichen qualitativen Differenzen zwischen verschiedenen untersuchten Zellen schon bei den einfachen Depolarisationen von Kap. 4.1. zeigen deutlich die Bedeutung der Identifizierung und Klassifizierung der Versuchsobjekte. Bisher vorgenommene Einteilungen der Somazellen von Helix beruhten vor allem auf deren Reaktion auf verschiedene als Überträgerstoffe bekannte Substanzen wie Acetylcholin, Dopamin oder Noradrenalin (Glaizner, 1967, Kerkut et al. 1975). Andere Charakterisierungsmerkmale waren die Form des Aktionspotentials (Sakharov und Salanki 1969, Walker et al. 1970) oder das Adaptionsverhalten bei Stimulation der Zellen (Colding-Jörgensen 1976). Die im Voltage-Clamp möglichen Untersuchungen ergaben als weiteres Merkmal zunächst den relativen Anteil des unterschwelligen Auswärts-Stroms (Neher 1971, Connor und Stevens 1971), der vor allem bei der Modulation der synaptischen Erregung effektiv ist (Daut 1973a,b). Die nun vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß sich aus der Untersuchung der bei Depolarisation der Membran fließenden Kalium-Auswärtsströme eine Unterscheidung von drei Typen ableiten läßt, die aus noch näher erläuterten Gründen mit M, C und P bezeichnet werden.
Eine direkte Korrelation mit den bisherigen Klassifizierungen ist am ehesten mit denen nach der Form des Aktionspotentials gegeben. Da seit der Arbeit von Lux und Eckert (1974) bekannt war, daß zwischen der charakteristischen Form der Aktionspotentiale der sog. Bursterzelle im rechten Parietalganglion von Helix pomatia (Sakharov und Salanki 1969) und spezifischen, Kalzium-abhängigen Prozessen in dieser Zelle ein Zusammenhang besteht, suchte ich in der Literatur gezielt nach Beschreibungen von Zellen, deren Aktionspotentiale einen ähnlichen Zeitverlauf aufwiesen. Dies führte dazu, daß die von Sakharov und Salanki (1969) als D-Gruppe bezeichneten Zellen als zum C-Typ gehörig identifiziert werden konnten.

Die Typen unterscheiden sich durch die relativen Anteile von zwei schon früher als verschieden erkannten Komponenten des Auswärtsstroms (Meech und Standen 1975, Heyer und Lux 1976), die jedoch an den bisher untersuchten identifizierten Zellen stets gemeinsam auftreten. Diese Zellen werden in der hier eingeführten Einteilung daher als M=Mischtyp bezeichnet, während Zellen mit entweder nur der Ca-abhängigen oder nur der ausschließlich vom Membran-Potential kontrollierten Komponente als C- bzw. P-Typ bezeichnet werden. Eine Parallelität verschiedener Transportsysteme für das gleiche Ion, wie sie für die M-Zellen angenommen wird,ist nicht ungewöhnlich, sondern

sowohl bekannt aus Untersuchungen des unterschwelligen Stroms an Helix-Zellen (Neher 1971, Connor und Stevens 1971, Gola und Romey 1971) wie auch an anderen Präparaten, wie etwa den Motoneuronen des Frosches (Barrett und Barrett 1976).

5.1.1. Der P-Typ

Die Strom-Spannungs-Kurven der Membranen des P-Typs sind unter Normalbedingungen stets monoton und im Potentialbereich oberhalb von etwa +10 mV linear oder nur leicht gekrümmt (Abb. 4.1.2). Im Bereich zwischen Ruhepotential und linearem Teil der Kennlinie schaltet der Strom potentialabhängig ein (Abb. 4.1.3). In Anlehnung an Hodgkin und Huxley (1952) kann der in Abb. 4.1.3.A aufgetragene Endwert des Auswärtsstromes ausgedrückt werden durch

$$I_\infty = \overline{g_K} \cdot n_\infty \cdot (V_M - V_0).$$

Dabei ist $\overline{g_K}$ die maximal erreichbare Kalium-Leifähigkeit, n_∞ ein ausschließlich vom Membranpotential anhängiger Aktivierungsparameter mit Werten zwischen 0 und 1, und V_0 ein effektives Gleichgewichtspotential, welches durch Differentiation nach V_M eliminiert werden kann. Man erhält dann

$$\frac{dI}{dV_M} = \overline{g_K} \cdot n_\infty.$$

Die Bestimmung des Werts von $\overline{g_K}$ wäre nur dann sinnvoll, wenn die Oberfläche der Membran bekannt wäre. Wegen der schon erwähnten Glia-Zellen um die eigentliche Membran sowie deren vielfachen mikroskopischen Einfaltungen ist die Oberfläche von Helix-Neuronen jedoch praktisch nicht zu bestimmen. Im weiteren wurde $\overline{g_K}$ daher auf 1 normiert. Zur Beschreibung der den Wert von n_∞ bestimmenden potentialabhängigen Ratenkonstanten k_{ZA} und k_{AZ} (siehe Kap. 4.8.1.) wurden, wieder gemäß Hodgkin und Huxley (1952), Funktionen der Form

$$k_{ZA} = a_1 \cdot \frac{V_M}{1-\exp\frac{-V_M}{a_2}}$$

$$k_{AZ} = b_1 \cdot \exp\frac{-V_M}{b_2}$$

angesetzt. Nach einem nichtlinearen Fit-Algorithmus für die vier freien Parameter nach der Methode der kleinsten Quadrate (Meeter und Marquart 1962) ist der Verlauf von n_∞ - bei Angabe des Membranpotentials in mV - zu beschreiben durch:

$$\frac{k_{ZA}}{k_{AZ}} = \frac{0.144 \cdot \frac{V_M}{1-\exp\frac{-V_M}{5.9}}}{\exp\frac{-V_M}{11.4}}$$

Die Absolutwerte der Ratenkonstanten ergeben sich dann aus den Zeitkonstanten des Anschaltens durch

$$\tau_A = \frac{1}{k_{ZA} + k_{AZ}} \quad .$$

Mit den in Abb. 4.8.1.B für T=20°C gegebenen Werten für τ_A erhält man schließlich die Absolutwerte der die Aktivierung der P-Komponente bestimmenenden Ratenkonstanten

$$k_{ZA} = 0.0074 \cdot \frac{VM}{1 - \exp\frac{-VM}{5.9}} \left[\frac{1}{ms}\right]$$

$$k_{AZ} = 0.051 \cdot \exp\frac{-VM}{11.4} \left[\frac{1}{ms}\right]$$

Wie aufgrund der langsamen Zeitverläufe der Auswärtsströme bei Helix pomatia nicht anders zu erwarten, liegen beide Werte mehr als eine Größenordnung unter den von Hodgkin und Huxley (1952) für das Tintenfisch-Axon angegebenen Werten.

Die Inaktivierung der P-Komponente im Laufe längerer Depolarisationen (Abb. 4.8.2) stellt insofern eine Besonderheit dar, als sie einerseits nicht vom Membranpotential beeinflußt wird, andererseits aber bei verschiedenen Zellen in ihrem Zeitverlauf sehr stark streut. Diese Resultate sind jedoch im Einklang mit den Ergebnissen von Magura et al. (1971), die potentialunabhängige Zeitkonstanten zwischen einigen 100 ms bis in den s-Bereich fanden.
Ein zwangsläufiger Obergang des Kanals aus dem geöffneten Zustand in einen dritten inaktivierten Zustand mit einer in diesem Fall potentialunabhängigen Ratenkonstante wäre durchaus denkbar. Ähnliche Modelle wurden für das Na-System der theoretisch wesentlich detaillierter untersuchten Membran des Tintenfisch-Axons bereits diskutiert (Hoyt 1968, Hoyt und Adelman 1970) als Alternative zu der von Hodgkin und Huxley (1952) gewählten Erklärung durch einen gleichzeitig mit der Aktivierung, jedoch langsamer verlaufenden Prozess erster Ordnung. Als Hinweis auf eine Kopplung zwischen Aktivierung und Inaktivierung kann die in Abb. 4.2.1 gezeigte Kennlinie der Inaktivierung der P-Komponente durch kurze Vorpulse herangezogen werden, die

sehr ähnlich wie die schon besprochene Aktivierungs-Kennlinie verläuft (es ist zu berücksichtigen, daß die beiden Meßserien an verschiedenen Zellen aufgenommen wurden). Es kann daraus geschlossen werden, daß beim P-System Depolarisation nur dann zur Inaktivierung führt, wenn vorher Kanäle geöffnet wurden. Unklar bleibt jedoch weiterhin die Ursache für die sehr unterschiedlichen Werte dieser Patenkonstante bei den einzelnen Zellen. Hierfür könnte es u.U. lohnend sein, in zukünftigen Arbeiten nach einem Zusammenhang zwischen dem Inaktivierungsverhalten und der Morphologie der Zelloberfläche zu suchen. Da dies zusätzliche histologische Techniken erfordert hätte, wurde dieser Frage in der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht weiter nachgegangen.

Die Versuche zur Beeinflussung der Kanäle des P-Systems durch injizierte Ionen ergab keine Überraschungen im Vergleich zu den Auswärtsströmen von Axon-Präparaten. Injiziertes TEA kann die Leitfähigkeit der Kanäle fast völlig blockieren (Abb. 4.7.2, vgl. Zitate in Kap. 4.7.), ebenso Barium (Abb. 4.6.4, vgl. dazu Narahashi 1961, Sperelakis et al. 1967) sowie Kobalt (Abb. 4.6.5).

Genauer untersucht wurden die Effekte der bei gekühlten Präparaten auftretenden Erhöhungen des intrazellulären Natrium und Kalzium. Das in Kap. 4.8. beschriebene nicht-lineare Verhalten wurde als Eigenschaft der bekannten Kalium-Systeme erregbarer Membranen bereits beschrieben (Meissner 1965, L.E. Moore 1967, Bezanilla und Armstrong 1972). Die von den letztgenannten Autoren angenommene Blockierung der Kanäle durch Na-Ionen, die in die unselektive innere Öffnung der Pore eindringen und sie unter Einfluß des starken elektrischen Feldes nur schwer wieder verlassen können, dürfte auch hier zutreffen. Neu ist an den Soma-Membranen die Ca-Empfindlichkeit des Effekts, die sich in der Reaktion auf die Injektion des Ca-Komplexbildners EGTA manifestiert (Abb. 4.8.10). Sie ist andererseits jedoch nicht erstaunlich, da die Ionenradien von Na und Ca mit 0.95 Å und 0.99 Å nahezu gleich sind.

Zur eindeutigen Separierung von der phänomenologisch ähnlichen nicht-linearen Kennlinie des C-Systems (Abb. 4.1.5) wurden Experimente wie das in Abb. 4.8.9 herangezogen. Es konnte gezeigt werden, daß unter diesen besonderen Umständen die Nicht-Linearität vom äußeren Ca unabhängig ist, durch injiziertes TEA, welches die P-Komponente blockiert, dagegen weitgehend beseitigt wird.

Den in Abb. 4.8.8 gezeigten Verläufen der momentanen Konduktivität in Abhängigkeit vom Beginn der Depolarisation ist gemeinsam, daß der aufgetragene Quotient $\frac{\Delta I}{I_o}$ im

Verlauf der Depolarisation zunehmend kleiner bzw. negativer wird. Der Grund dafür dürfte im während der Depolarisation fließenden persistierenden Ca-Strom zu suchen sein (Lux und Eckert 1974, Eckert und Lux 1976), der zeitabhängig zu einer Erhöhung der Ca-Aktivität an der Innenseite der Membran und damit zu einer stärkeren Ausprägung der nicht-linearen Effekte führt. Für das letztendliche Ansteigen der Kurven in Abb. 4.8.8.B ist dagegen die in diesen Potentialbereichen stets beachtliche Leckkomponente verantwortlich, die sich linear bzw. bei höheren Potentialen auswärtsgleichrichtend verhält (Adelman und Taylor 1961, siehe auch Abb. 4.7.3). Durch die notwendige Normierung auf den jeweils fließenden Summenstrom I_0 wird für Membranen mit einer relativ kurzen Inaktivierungszeitkonstante des P-Systems (s.o.) bald diese Leckkomponente maßgeblich und damit insgesamt die Nicht-Linearität des P-Systems im Gesamtauswärtsstrom nicht mehr auffällig.

5.1.2. Der C-Typ

Eindeutiges Charakteristikum des Auswärtsstroms der Zellen des C-Typs ist seine Eigenschaft, nur bei bzw. nach Einstrom von Ca-Ionen durch die Membran durch eine Depolarisation aktivierbar zu sein. Da dieser Einstrom der doppelt positiv geladenen Ca-Ionen bei Depolarisationen von etwa +100 mV und darüber durch das elektrische Feld über der Membran verhindert wird, zeigen diese Zellen des C-Typs bei einfachen rechteckförmigen Depolarisationen sogen. N-förmige I-V-Kurven (Abb. 4.1.5). Der sekundäre ansteigende Ast der Kennlinie wird dabei von der in diesem Potentialgebiet nicht weit vom dielektrischen Durchbruch der Membran steil ansteigenden Leckstrom getragen, der jedoch keine Besonderheit dieses Zelltyps darstellt. Weitere Beweise für die absolute Abhängigkeit vom Ca-Influx ergeben sich aus der Blockierung bei Verminderung der Ca-Aktivität in der Badflüssigkeit (Abb. 4.5.1) sowie bei Zugabe der Ca-Blocker wie Ni, Co, Mn oder La (s. Kap. 4.5.3. und 4.5.4.).

Da die Aktivierung dieser Stromkomponente in den beiden folgenden Abschnitten anhand eines kinetischen Modells noch eingehend diskutiert werden wird, sind hier nur noch die Befunde erwähnt,die sich auf den Ionenfluß durch die geöffneten Kanäle des C-Systems beziehen. Zunächst ist festzustellen, daß der durch dieses System getragene Kaliumstrom - im Gegensatz zum P-System - nicht durch TEA blockiert wird; dies wird schon daraus deutlich, daß die Auswärtsströme von mit TEA injizierten Zellen des M-Typs nicht einfach kleiner sind als vor der Injektion, sondern im Zeitverlauf den Strömen der Zellen des C-Typs sehr ähnlich werden (Abb. 4.7.4). Unterstrichen wird

die Aussage noch durch den Befund, daß die stromvergrößernde Wirkung kleiner depolarisierender Vorpulse bei hohen Testdepolarisationen, die - wie im folgenden Kapitel 5.2. gezeigt wird - ein Charakteristikum des C-Systems ist, nicht nur relativ, sondern sogar in absoluten Werten vergrößert wird (Abb. 4.7.5).

Ebenso deutet auch der mit Werten bis über 2 ungewöhnlich hohe Q_{10} der Amplitude des Auswärtsstroms (Abb. 4.8.6) auf einen deutlich anders gearteten Mechanismus des Ladungstransportes hin. Insbesondere ist dieser Wert auffällig im Vergleich mit den entsprechenden Q_{10} des P-Systems sowie des zeitunabhängigen Leckstroms, die beide mit einem im wesentlichen durch Diffusion bestimmten Ladungstransport übereinstimmen.

5.1.3. Der M-Typ

Die Zellen dieses Typs werden als Mischtyp bezeichnet, da ihr Auswärtsstrom sowohl durch Kanäle des P-Typs wie des C-Typs, die offenbar beide nebeneinander in diesen Membranen vorhanden sind, getragen wird. Die Zeitverläufe der Auswärtsströme weisen bei höheren Depolarisationen daher typischerweise zwei relative Maxima auf (Abb. 4.1.9). Das erste, scharf ausgeprägte Maximum wird von der P-Komponente erzeugt, das später auftretende, stets wesentlich flachere dagegen vom Anteil der C-Komponente am Gesamtstrom. Dieses stark unterschiedliche Anschaltverhalten der beiden Komponenten bei höheren Depolarisationen erwies sich in den Experimenten als eine besonders vorteilhafte Eigenschaft, da es eine direkte Beurteilung der Wirkung von Vorpulsen, Veränderungen der Außenkonzentrationen oder Injektionen erlaubte [1]. Je nach dem Zeitpunkt der Messung ab Einsatz der Depolarisation ist die I-V-Kennlinie also auch entweder monoton wie bei den Membranen des P-Typs oder N-förmig wie bei denen des C-Typs (Abb. 4.1.1o).

Die Identität der schnellen Komponente des M-Typs mit dem P-System wurde zwar nicht im einzelnen nachgewiesen, doch sind Aktivierungskinetik (vgl. Abb. 4.1.1.B und 4.1.8) und Empfindlichkeit gegen TEA-Injektion (vgl. Abb. 4.7.1 und 4.7.3) äußerst

1) Eine ähnlich charakteristische Separation ist allerdings nicht in den von Meech und Standen (1975) gezeigten Strömen zu sehen, obwohl dort auf ebenso hohe Potentiale depolarisiert wurde. Der Unterschied kann darin begründet sein, daß diese Autoren winterschlafende Schnecken benutzten, die einen veränderten Metabolismus aufweisen (Meincke 1974, 1975).

ähnlich. Es wurde in den Experimenten ja allgemein festgestellt, daß M-Zellen, bei denen das C-System blockiert wurde, sich im wesentlichen wie P-Zellen verhielten (siehe Kap. 4.4. und 4.5.). Dies bezieht sich allerdings nur auf die Auswärtsströme, da bei Ausschaltung des C-Systems der M-Zellen durch Injektion von EGTA über einen größeren Potentialbereich beträchtliche Einwärtsströme fließen (Abb. 4.4.2 und 4.4.7), die bei P-Zellen nicht zu beobachten sind. Diese Einwärtsströme sind jedoch Folge der durch EGTA bewirkten Entkopplung des Ca-Influx vom K-Efflux, der bei der Diskussion des Modells des C-Systems näher erläutert wird, so daß sich hieraus kein Grund für eine Verschiedenheit zwischen dem schnellen System der M-Zellen und dem P-System ableiten läßt.

Von den eigenen Beobachtungen abweichende Ergebnisse bezüglich der Inaktivierung des Auswärtsstroms bei nicht näher identifizierten Neuronen von Helix pomatia lassen sich aus dem gemeinsamen Vorkommen der potentialunabhängig inaktivierenden P-Komponente mit der C-Komponente bei Zellen des Mischtyps erklären. Es war eine Beschleunigung der Inaktivierung sowohl mit steigender Depolarisation (Kostyuk et al. 1975a) als auch durch Anwendung von Verapamil (Kostyuk et al. 1975b) beschrieben worden, das bisher nur als Blocker des Ca-Einstroms bekannt war, und dem nunmehr auch eine sog. "pharmakologische" Wirkung zugeschrieben wurde. In beiden Fällen findet jedoch unter diesen Umständen eine Abnahme des relativen Anteils des C-Stroms, der langsam oder garnicht inaktiviert, am Gesamtstrom statt, der zur Beschleunigung der phänomenologischen Inaktivierung des Gesamtstroms führt. Eine entsprechende Variabilität der Inaktivierung des Summenstroms von M-Zellen bei Anwendung der in dieser Arbeit verwendeten Methoden zeigen u.a. die Abb. 4.2.20, 4.4.4 und 4.5.13.

Eine bei den Zellen des C-Typs nicht vorhandene Eigenschaft des Ca-kontrollierten Systems der M-Zellen stellt die Inaktivierung oder "Depression" nach vorangegangener Erhöhung der intrazellulären Ca-Aktivität durch Ca-Einstrom durch die Membran (Abb. 4.2.17 bis 4.2.21) oder durch direkte Injektion (Abb. 4.6.1) dar. Dieser Befund steht im Einklang mit der bei Bursterzellen gefundenen Verminderung des K-Efflux unter ähnlichen Bedingungen (Heyer und Lux 1976). Die Separation wurde dort primär aufgrund der unterschiedlichen Reaktion bei Blockierung der extrazellulären Ca-durch Co-Ionen sowie bei Injektion von TEA vorgenommen, wodurch auf eine spezifische Wirkung gerade auf die Ca-aktivierte Komponente geschlossen werden konnte.

Durch die nun vorgelegten Ergebnisse bei höheren Depolarisationen wird dies bestätigt. Die Methode der "Injektion" von Ca durch sehr kleine Vorpulse, bei denen noch keine Aktivierung der Membran erfolgt (Kap. 4.2.), erlaubt die Untersuchung der Ca-Wir-

kungen mit guter zeitlicher Auflösung. Dabei wurde unmittelbar klar, daß die depressive Wirkung der Ca-Ionen nicht das Anschalten des Stroms zur Voraussetzung hat (Abb. 4.2.19). Die Inaktivierung dieser Komponente verhält sich also gerade umgekehrt wie die der P-Komponente. Außerdem läßt sich mit der Methode der Vorpulse die duale Wirkung des durch die Membran eingeströmten Kalziums beobachten, die in erster Linie von der Dauer des Vorpulses abhängt (Abb. 4.2.18).

Bei Verlängerung des Vorpulses wird einerseits durch Akkumulation die Ca-Aktivität an der Innenseite der Membran weiter ansteigen, unabhängig davon ergibt sich jedoch zum Zeitpunkt des Testpulses auch eine längere Einwirkungsdauer des erhöhten Ca-Spiegels. Wie aus den früheren Doppelpulsexperimenten (Neher und Lux 1972, Gola 1974) schon hervorgeht, spielt der Zeitfaktor die wesentliche Rolle bei der Depression des Auswärtsstroms (Abb. 4.2.21).
Das Ausmaß der Depression bei verschiedenen Zellen in Abhängigkeit von Höhe und Dauer des Vorpulses war keine feste Größe, ebenso wie auch der Obergang vom Mischtyp zum P- bzw. C-Typ nicht exakt definierbar war.
Beim Oberblick über die Gesamtheit der etwa sechzig in dieser Hinsicht untersuchten Zellen läßt sich jedoch ein Zusammenhang zwischen dem relativen Verhältnis der beiden Stromkomponenten und der Depression feststellen. Diese war am ausgeprägtesten bei den Zellen des Mischtyps, die einen markanten potentialgesteuerten Strom aufwiesen. Aus den Ergebnissen ist allerdings nicht zu entscheiden, ob hier wirklich ein kausaler Zusammenhang besteht oder ob nicht vielmehr die Zellen der verschiedenen Typen auch höchst unterschiedlich effektive Regulationssysteme zur Konstanthaltung des intrazellulären Ca-Spiegels aufweisen. Für die physiologische Aktivität der Zellen des C-Typs, die allgemein als regelmäßige Schrittmacher auch ohne synaptische Erregung vorgefunden wurden, wäre die Depression sicher ungünstig, da sie eine Verbreiterung der Aktionspotentiale bewirkt. Diese führt zu noch erhöhtem Ca-Einstrom und damit zu weiterer Depression, so daß also eine positive Rückkopplung vorliegt, die nur als Verstärker für äußere Einflüsse sinnvoll erscheint.

5.2. Aktivierung des Ca-kontrollierten Systems

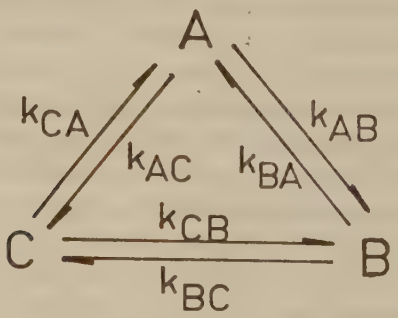
Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen der von Prof.H.D.Lux am MPI für Psychiatrie langjährig persönlich verfolgten Untersuchungen Kalzium-abhängiger Prozesse an neuronalen Membranen. Ausgehend von einer Fülle von Befunden , die mit ausgefeilten quantitativen Methoden erhoben wurden, formulierte er das Prinzip der Kopplung von Ca- und K-Strömen in einem unitären System (siehe Lux und Hever 1979).

Gleichzeitig konnte die von Meech und Standen (1975) vertretene Auffassung widerlegt werden, daß das System des Ca-aktivierten Auswärtsstroms identisch ist mit der nach Injektion von $CaCl_2$-Lösungen zu beobachtenden erhöhten Kalium-Konduktivität am Ruhepotential (Meech, 1974).

Aus der gemeinsamen Diskussion der Experimente und unter Verwendung der an den Zellen des C-Typs gewonnenen Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit geschildert sind, wurde es möglich, über die kinetischen Schritte der Aktivierung des C-Systems genauere Aussagen zu machen. Die dabei zu berücksichtigenden Fakten lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Die Strom-Spannungs-Relation ist N-förmig, mit einem Maximum zwischen +50 mV und +100 mV sowie einem Minimum bei um etwa 50 mV höheren Werten.
2) Bei Membranpotentialen über etwa +30 mV wird der Stromanstieg mit höherer Depolarisation zunehmend langsamer (siehe auch Lux und Heyer 1979).
3) Kleine depolarisierende Vorpulse vor Testpulsen auf ein Potential jenseits des Maximums der Kennlinie vergrößern den Auswärtsstrom der Testpulse, so daß sich dann eine monotone I-V-Kennlinie ergibt.
4) Diese Stromerhöhung ist innerhalb bestimmter Grenzen der Dauer des Vorpulses proportional.
5) Die Effektivität von Vorpulsen steigt mit deren Höhe bis zu einem Maximum um +50 mV, während noch höhere Vorpulse wieder zunehmend weniger effektiv sind.
6) Nach solchen Vorpulsen ist die Aktivierungszeitkonstante unabhängig von der Höhe des Testpulses.
7) Nach erfolgter Aktivierung unterliegt der Strom auch bei höheren Testpulsen keiner Inaktivierung.
8) Bei Repolarisation der Membran schließt der Kanal schnell, die Aktivierbarkeit auch durch hohe Testpulse ohne Vorpuls nimmt dagegen wesentlich langsamer ab.
9) Das Maximum der IV-Kurve verschiebt sich bei 10-facher Änderung der Konzentration des extrazellulären Kalzium um etwa 30 mV in positiver Richtung.
10) Bei Blockade des extrazellulären Kalzium ist der Auswärts-Strom nicht mehr aktivierbar.
11) Bei Ersatz des extrazellulären Kalzium durch Strontium oder Barium nimmt der Einwärtsstrom in der Reihenfolge Ca< Sr< Ba zu, gleichzeitig nimmt der Auswärtsstrom in der gleichen Reihenfolge ab (siehe auch Lux und Heyer 1979).
12) Bei intrazellulärer Injektion von EGTA wird die IV-Kennlinie linearisiert durch Verminderung des Stroms um das Maximum.

Aus den Punkten 1), 9) und 10) folgt, daß der Einstrom extrazellulären Kalziums eine wesentliche Bedingung für die Aktivierung ist. Sie unterbleibt, wenn dieser Einstrom entweder durch ein entgegengerichtetes elektrisches Feld, durch die Reduktion der extrazellulären Ca-Konzentration oder durch Blockierung unterbunden wird. Allerdings ist es offensichtlich nicht erforderlich, daß der Ca-Strom gleichzeitig mit dem K-Auswärtsstrom fließt (Punkt 3) und 5)), sondern es genügt, wenn der Einstrom kurz vorher erfolgt. Dagegen ist andererseits die durch und während des Vorpulses erhöhte intrazelluläre Ca-Konzentration allein auch noch nicht in der Lage, die K-Konduktivität zu aktivieren (Punkt 6) und 8)), vielmehr ist die Depolarisation der Membran zusätzlich essentiell erforderlich. Im einfachsten Falle wären nur zwei Zustände des K-Systems zu berücksichtigen: geschlossen und offen, wobei die Öffnung unter gleichzeitiger Depolarisation und Ca-Einstrom erfolgte. Ein solches Modell kann jedoch die Punkte 3) und 8) nicht befriedigen, da es jedenfalls einen Zustand des Kanals gibt, der zwar selbst keine K-Leitfähigkeit aufweist, sich aber dennoch eindeutig vom Ruhezustand unterscheidet. Das Modell muß also mindestens drei Zustände berücksichtigen, die im folgenden A, B und C genannt werden. Dabei sei A der geschlossene Zustand in Abwesenheit von Kalzium bzw. nach längerer Pause am Ruhepotential, B der Zustand, der durch einen kleinen Vorpuls erzeugt wird, aber noch keine K-Leitfähigkeit besitzt, C schließlich der sich daraus bei Depolarisation entwickelnde Kalium-leitende Zustand. Für diese drei Zustände erhält man das folgende allgemeine kinetische Schema:



Der Übergang von A nach B ist nur während dem Einstrom von Ca-Ionen möglich, der bereits ab relativ kleinen Depolarisationen von -25 mV aufwärts einschaltet (Eckert und Lux 1976). Eine Potentialabhängigkeit ist dadurch gegeben, daß eine Aktivierung des Ca-Systems wie im Modell von Hodgkin und Huxley (1952) angenommen wird, u.U. noch in Verbindung mit einer langsamen Inaktivierung (Kostyuk und Krishtal 1977). Aufgrund der extrem unterschiedlichen Ca-Aktivitäten auf beiden Seiten der Membran ist jedoch ein linearer Ansatz der Form

$$I_{Ca} = g_{Ca} \cdot (V_M - V_{Ca})$$

wie dort für das Na-System nicht angebracht. Eine bessere Näherung für solche Fälle stellt die Constant-Field-Gleichung nach Goldman, Hodgkin und Katz dar (Goldman 1943, Hodgkin und Katz 1949), die eine spezielle Lösung der Nernst-Planck'schen Elektrodiffusionsgleichung ist, unter der vereinfachenden, aber angesichts der geringen Stärke der Membran annähernd richtigen Bedingung einer konstanten Feldstärke (Barr 1965, Bass 1974). Bei gegebener Permeabilität P_{Ca} gibt sie den Verlauf des Netto-Fluxes in Abhängigkeit vom Potential an mit

$$I_{Ca}(V_M) = \frac{P_{Ca} \cdot V_M \cdot \left(\left[Ca^{2+}\right]_i - \left[Ca^{2+}\right]_a \cdot \exp\left(\frac{F \cdot V_M}{2\,RT} \right) \right)}{1 - \exp\left(\frac{F \cdot V_M}{2\,RT} \right)}$$

Eine weitere explizite Potentialabhängigkeit der Rate k_{AB} erscheint nicht erforderlich.

Als eine zu den Auswärtsströmen anderer Präparate wie auch der Zellen des P-Typs besonders stark kontrastierende Eigenschaft ist die Unabhängigkeit der Anstiegszeitkonstanten des Stroms nach kleinen Vorpulsen vom Potential anzusehen. Dennoch ist andererseits die Depolarisation der Membran unabdingbare Voraussetzung zur Aktivierung. Dieses Verhalten wird möglich, wenn zwar der Übergang B⟶C mit konstanter Geschwindigkeit erfolgt, die Rückreaktion C⟶B jedoch in dem Sinne potentialabhängig ist, daß k_{CB} mit steigender Depolarisation kleiner wird. Die Ratenkonstante k_{BC} ergibt sich dann einfach aus dem Grenzwert der Aktivierungszeitkonstanten als

$$k_{BC} = 1/\tau_A \quad \text{, wenn } k_{CB} = 0, \text{ denn } \tau_A = \frac{1}{k_{BC} + k_{CB}}$$

Das experimentell beobachtete beschleunigte Abschalten mit zunehmend negativerem Membranpotential ist damit ebenfalls befriedigend erklärt (Pkt. 8)).

Die Ratenkonstante k_{AC}, die die direkte Aktivierung des Kanals ohne vorherige Bindung von Kalzium bestimmt, ist nach den Versuchsergebnissen praktisch so klein, daß sie zu Null gesetzt wird. Das gleiche gilt für die Konstante k_{CB}, die einen unmittelbaren Übergang in den Ca-freien Ausgangszustand beim Schließen des Kanals bedeutet.

Aufgrund Pkt. 8) findet dieser Obergang jedoch nicht statt, vielmehr wird stets zunächst der Obergangszustand B eingenommen. Erst aus diesem heraus erfolgt der Übergang zum Ruhezustand mit der Ratenkonstanten k_{BA}. Sie wird als konstant angenommen. Weitere Hinweise auf den Mechanismus der Aktivierung erhält man aus den Ergebnissen von Injektionen der Ca-Komplexbildner EDTA und EGTA. Zunächst scheinen diese die Auffassung zu bestätigen, daß die Aktivierung durch erhöhte intrazelluläre Konzentration von Ca-Ionen hervorgerufen wird (Meech und Standen 1976). Dagegen sprechen jedoch die Messungen von Heyer und Lux (1977) mit dem Ca-sensitiven Photoprotein Aequorin. Dort wurde gezeigt, daß zwischen der Abnahme des Auswärtsstroms im Verlauf der N-förmigen Kennlinie und der intrazellulären Ca-Aktivität kein quantitativer Zusammenhang besteht. Auch war es bisher in keinem Fall möglich, durch Injektion von Ca-Ionen bei gleichzeitiger Unterbindung des Ca-Einstroms von außen die Aktivierung des Auswärtsstroms zu erzielen. Es muß daher geschlossen werden, daß die Bindungsstell für Kalzium so innerhalb der Membran liegt, daß sie von innen nicht erreichbar ist.

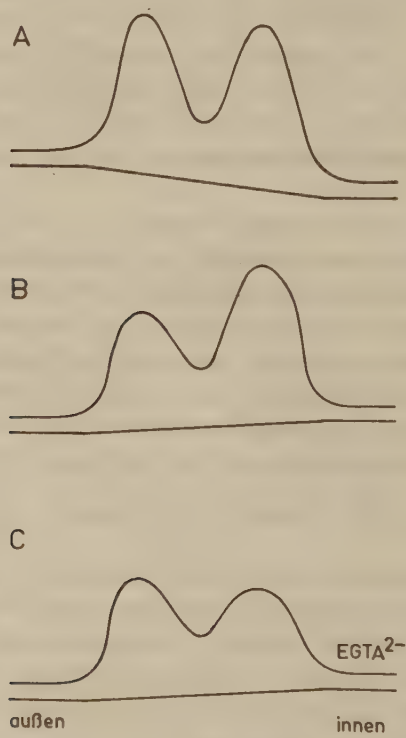


Abb. 5.2.1 Schematische Darstellung des angenommenen Energieprofils über der Membran in drei verschiedenen Zuständen: Am Ruhepotential (A), depolarisiert (B) und depolarisiert und nach intrazellulärer Injektion von EGTA (C).

Das dafür notwendige Energieprofil über der Membran für Ca-Ionen entspricht im wesentlichen dem, wie es schon in verschiedenen theoretischen Arbeiten über den Ionentransport durch Membranen angenommen wurde (Hall et al. 1973, Frehland und Läuger 1974). Abb. 5.2.1 zeigt dieses Profil für verschiedene Bedingungen. Kennzeichnend sind die äußeren Energiemaxima mit dem dazwischenliegenden Energieminimum, der Bindungsstelle.

Bei der Depolarisation wird der Potentialwall an der Außenseite vermindert, so daß die Bindungsstelle für extrazelluläres Kalzium zugänglich wird. Wenn ein Ca-Ion gebunden ist, kann die Konformationsumwandlung in den Kalium-leitenden Zustand C erfolgen. Dies entspricht dem aus der Proteinchemie allgemein bekannten Reaktionsschema der Kalzium-Bindung an Proteine (Williams 1976). Wird dagegen vor der Umwandlung auf das gebundene Ca-Ion von einem von außen nachkommenden Energie übertragen, so kann es die innere Potentialbarriere überwinden und trägt zum Ca-Einwärtsstrom bei. Die beiden anderen untersuchten Erdalkali-Ionen Strontium und Barium werden offensichtlich weniger stark gebunden, die Aktivierung durch beide Ionen ist deshalb kleiner, während der Einwärtsstrom größer ist.

Die Wirkung der Injektion von Di-K-EDTA und Di-K-EGTA, die beide in Lösung als divalente Anionen vorliegen, beruht nun auf deren Wirkung auf den Potentialwall an der Innenseite der Membran. Wie Parsegian (1975) zeigte, kann ein einzelnes Ion aufgrund der niedrigen Dielektrizitätskonstante der Membran von etwa 3 bis zu einer Entfernung von 3.5 nm ein Feld erzeugen, das größer ist als die Durchbruchsfeldstärke. Aufgrund dieser in die Membran hineinreichenden Attraktion der komplexbildenden Anionen wird daher die mittlere Bindungsdauer der von außen eintretenden Ca-Ionen soweit vermindert, daß die Wahrscheinlichkeit der Konformationsänderung in den K-leitenden Zustand stark herabgesetzt ist. Vor allem zwei experimentelle Ergebnisse stützen diese Vorstellung.

Während nämlich, wie in Kap. 4.4. gezeigt, nach der EGTA-Injektion die Spannungskennlinien des Netto-Stroms stets monoton sind, sind die Kennlinien des K-Efflux gegen das Potential weiterhin N-förmig, allerdings auf stark vermindertem Niveau (Heyer et al. 1976). Das ist nur erklärlich unter der Annahme einer verminderten Kopplung zwischen Ca- und K-Flux, wie er sich aus dem vorgeschlagenen Modell ergibt.

Weiter wurde beobachtet,daß der Einstrom durch die Ca-Kanäle stark zunimmt, wenn sich an der Innenseite der Membran EGTA befindet (Kostyuk und Krishtal 1977). Auch dieser Befund deutet auf eine verminderte Energieschwelle für den Einstrom und steht in Übereinstimmung mit den eigenen Beobachtungen, daß der Netto-Einstrom durch EGTA-Injektionen enorm vergrößert wird.

5.3. Mathematische Formulierung und Simulation eines kinetischen Modells.

Unter Zugrundelegung des im vorigen Abschnitt entwickelten kinetischen Schemas und Verwendung der an den Zellen des C-Typs gemessenen Clamp-Ströme ist es möglich, ein mathematisches Gleichungssystem zu formulieren, dessen Lösungskurven die wichtigsten Eigenschaften dieser Zellen befriedigend widergeben. Dafür ist nur noch notwendig, die Zahlenwerte der Ratenkonstanten sowie deren eventuelle Abhängigkeit vom Membranpotential zu bestimmen. Um die kennzeichnenden Grundzüge des Modells besonders klar herauszustellen, soll nur eine minimale Zahl freier Parameter eingeführt werden.
Aus diesem Grund werden k_{BA} und k_{BC} als potentialunabhängige Konstanten angenommen. Auch die Bindungsreaktion $A + Ca \rightleftharpoons B$ als solche ist nicht explizit potentialabhängig, sondern wird als direkt proportional dem momentanen Kalzium-Einstrom gesetzt:

$$k_{AB} = \overline{k_{AB}} \cdot I_{Ca}\,(V_M,t) \qquad (5.3.1.)$$

Erst I_{Ca} selbst ist also eine Funktion von Potential und Zeit. Für k_{CB} muß eine explizite Abhängigkeit vom Membranpotential angesetzt werden.

Zu lösen ist somit das folgende System zweier linearer Differentialgleichungen, das noch durch die zusätzliche Bedingung ergänzt wird, daß die Gesamtzahl der Kanäle in allen drei Zuständen konstant ist. Die Variablen A, B und C bezeichnen dabei im folgenden die Besetzungsdichten der entsprechenden Zustände:

$$\dot{A} = B \cdot k_{BA} - A \cdot \overline{k_{AB}} \cdot I_{Ca}\,(V_M,t) \qquad (5.3.2.)$$

$$\dot{C} = B \cdot k_{BC} - C \cdot k_{CB}\,(V_M) \qquad (5.3.3.)$$

$$A + B + C = 1 \qquad (5.3.4.)$$

Da außer bei den allerkleinsten Depolarisationen der wesentlich größere Auswärtsstrom den Ca-Einstrom $I_{Ca}\,(V_M,t)$ völlig überdeckt, ist dessen direkte Bestimmung über einen weiteren Potentialbereich nicht möglich. Eine methodisch einfache Abschätzung des Verlaufs von k_{AB} läßt sich jedoch mittels der Methode kurzer Vorpulse gewinnen. Aufgrund der relativ kleinen Ratenkonstante k_{BC} findet bei diesen zunächst noch keine wesentliche Öffnung der Kanäle durch Übergänge $B \longrightarrow C$ statt, sodaß die Zahl der Kanäle im Zustand B unmittelbar nach dem Vorpuls als Maß für die gesuchte Größe k_{AB} benutzt werden kann. B wird ermittelt durch eine anschließende, sehr hohe Depolarisation, bei der kein Ca mehr einströmt und daher keine weiteren

Übergänge A ⟶ B mehr stattfinden, durch die starke Verminderung der Ratenkonstanten k_{CB} jedoch alle im Zustand B befindlichen Kanäle in den Zustand C übergehen. Deren Zahl, die dem gemessenen Strom proportional ist, ist damit direkt mit der Größe des Ca-Einstroms beim Vorpuls verknüpft. Die Beziehung wäre nur dann linear, wenn die Zahl B auch für die maximal vorkommenden Ca-Ströme immer klein gegen eins wäre. Wie die Resultate zeigen, ist dies jedoch auch für Pulse von nur 10 ms Dauer keineswegs der Fall. Es ist aber auch nicht sinnvoll, wesentlich kürzere Vorpulse zu benützen, da der Ca-Strom selbst eine gewisse Zeit zum Einschalten braucht (siehe Abb. 4.2.8).

Aus dem Zeitverlauf der transienten Netto-Einwärtsströme ist ersichtlich, daß diese Zeit mit höheren Depolarisationen kürzer wird, ganz ähnlich wie dies im Hodgkin-Huxley-Modell für den Na-Einwärtsstrom gilt. Dadurch ist die effektive Zeit des Ca-Einstroms für verschieden hohe Vorpulse trotz gleicher Dauer der Clamp-Pulse verschieden, und zwar verlängert sie sich für höhere Depolarisationen. Ein teilweise übermäßig steiler Verlauf der so berechneten Potentialabhängigkeit ist also u.U. zu erwarten.

Während dem Vorpuls ist $k_{CB} \gg k_{BC}$ und man kann daher den Obergang nach C vernachlässigen. Es gilt dann:

$$\dot{B} = -\dot{A} = A \cdot \overline{k_{AB}} \cdot I_{Ca}(V_M,t) - (1-A) \cdot k_{BA} \qquad (5.3.5.)$$

Wenn nach einer längeren Pause am Ruhepotential B(t = 0) = 0 gesetzt wird, so ergibt sich die Lösung:

$$B(t) = \frac{\overline{k_{AB}} \cdot I_{Ca}}{\overline{k_{AB}} \cdot I_{Ca} + k_{BA}} \left(1 - e^{-t \cdot (k_{AB} \cdot I_{Ca} + k_{BA})}\right) = B_\infty(V_M)\left(1 - e^{-t/\tau}\right) \qquad (5.3.6.)$$

wobei t vom Beginn des Vorpulses zählt. Unter Einschluß einer Verzugszeit t_0 zur Berücksichtigung der Anschaltzeit des Ca-Einstroms gilt:

$$B(t) = B_\infty(V_M) \cdot \left(1 - e^{-(t-t_0)/\tau}\right) \qquad (5.3.7.)$$

$$\ln\left(1 - \frac{B(t)}{B_\infty(V_M)}\right) = -\frac{1}{\tau} \cdot (t - t_0) \qquad (5.3.8.)$$

Beim Auftragen von $\ln\left(1 - \frac{B}{B_\infty}\right)$ für verschieden lange Vorpulse konstanter Höhe ergibt sich also eine Gerade mit der Steigung $-1/\tau$, die die t-Achse im Punkt t_0 schneidet. Unter Verwendung der Werte der Abb. 4.2.8 erhält man so für eine Vor-Depolarisation auf +20 mV : τ = 15.6 ms, t_0 = 2.6 ms. Die Zahlenwerte ergaben sich durch An-

passung einer Ausgleichsgeraden mit der Methode der kleinsten Quadrate (Korrelationskoeffizient 0.994).

Durch Einsetzen beider Werte in die Formel für einen Vorpuls von 10 ms erhält man:

$$1 - e^{-(10-2.6)/15.6} = 0.38$$

und daraus, zusammen mit den experimentellen Werten für den Auswärtsstrom:

$$\overline{k_{AB}} \cdot I_{Ca}(+20) = 65 \cdot k_{BA}$$

Mit dem so ermittelten Verhältnis von k_{AB} zu k_{BA} sowie der in Näherung als konstant angesehenen Verzugszeit von 2.6 ms ergibt sich nunmehr I_{Ca} (V_M) implizit aus Formel (5.3.7.) bei Variation der Höhe von Vorpulsen konstanter Dauer.

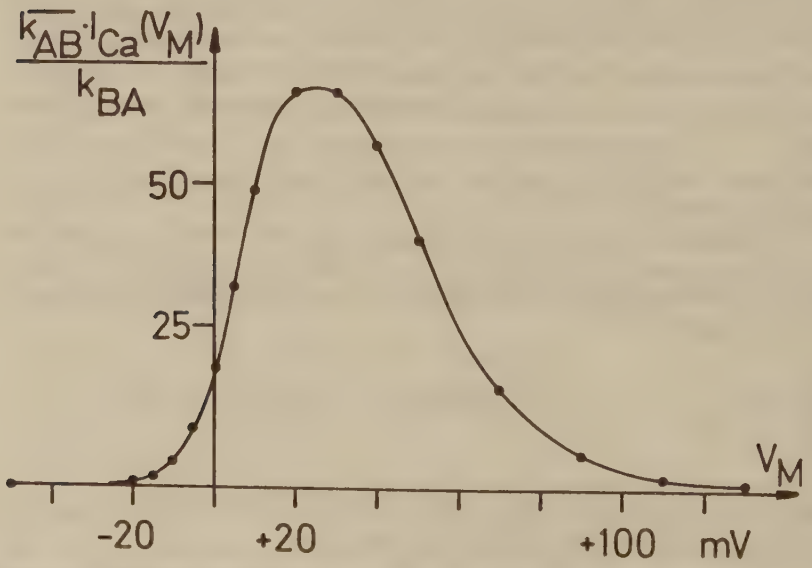


Abb. 5.3.1 Verlauf der zur Berechnung der Modellkurven verwendeten Größe $\frac{\overline{k_{AB}} \cdot I_{Ca}(V_M)}{k_{BA}}$ in Abhängigkeit vom Membranpotential. Herleitung der Kurve siehe Text.

Mit den experimentellen Werten der Abb. 4.2.10.B verläuft der Ca-Einstrom wie in Abb. 5.3.1 gezeigt. I_{Ca} (+120) ist dabei gleich 0 gesetzt. Diese Kurve wird bei der weiteren Berechnung des Modells zugrundegelegt.

Mit der Goldman'schen Constant-Field-Gleichung (Goldman 1943) läßt sich daraus die Permeabilität berechnen. Eine kinetische Simulation der Ca-Permeabilität war jedoch nicht möglich, da für diesen Zweck auf dem Analogrechner zusätzlich für den für das Programm der Formeln des Auswärtsstroms verwendeten Rechenelementen keine weiteren Integratoren mehr frei waren.
Stattdessen wurde die Kurve der Abb. 5.3.1 mit einem einstellbaren Funktionsgeber direkt eingestellt, und der Stromanstieg gegenüber dem rechteckförmigen Potentialsprung mit einem einfachen RC-Glied so verschliffen, daß für die Depolarisationen, bei denen experimentell die deutlichsten Netto-Einwärtsströme auftraten, die berechneten Stromtrajektorien am besten den experimentellen Werten entsprachen. Der Fehler durch diese konstante Einschaltkinetik erwies sich als nicht schwerwiegend. Das extrem schnelle Abschalten des Ca-Einwärtsstroms bei Repolarisation der Membran (siehe Abb. 4.4.11) wurde durch Oberbrücken des Filters mit einer Diode simuliert.
Als nächstes wird die Spannungsabhängigkeit der Ratenkonstanten k_{CB} festgelegt. Die einfachste und naheliegendste Form ist der sich aus der Eyring'schen Ratentheorie (Johnson et al. 1954) ergebende Ansatz:

$$k = \varkappa \cdot \frac{kT}{h} \cdot e^{-\Delta F^{\ddagger}/RT} \qquad (5.3.9.)$$

Dabei ist $\varkappa$ der Transmissionskoeffizient (≈ 1), die übrigen Konstanten haben ihre übliche Bedeutung. $\Delta F^{\ddagger}$ ist die zur Erreichung des Obergangszustandes bei der Konformationsumwandlung erforderliche Gibbs'sche freie Energie. Wird diese durch das Membranpotential verändert, so ergibt sich bei konstanter Temperatur eine potentialabhängige Ratenkonstante der Form

$$k_{CB}(V_M) = \overline{k_{CB}} \cdot e^{-V_M/C} \qquad (5.3.10.)$$

Um das sehr steile Einschalten des Auswärtsstroms im Potentialbereich zwischen -10 und +10 mV befriedigend zu simulieren, wird C = 6.25 mV gewählt. Dies entspricht der Energie von vier Elektronenladungen im Feld des Membranpotentials. Eine solch steile Abhängigkeit der Ratenkonstanten vom Potential ist allgemein typisch für erregbare Membranen. Der entsprechende Verlauf von k_{CB} wurde am zweiten Funktionsgeber des Analogrechners eingestellt. Wegen der begrenzten Dynamik der Verstärker konnten die sich rechnerisch ergebenden sehr hohen Werte für negative Potentiale allerdings nicht mehr vollständig eingestellt werden. Daher ist das Abschalten der Kalium-Konduktivität nach einem depolarisierenden Puls in den simulierten Kurven langsamer als es den Gleichungen entspricht.

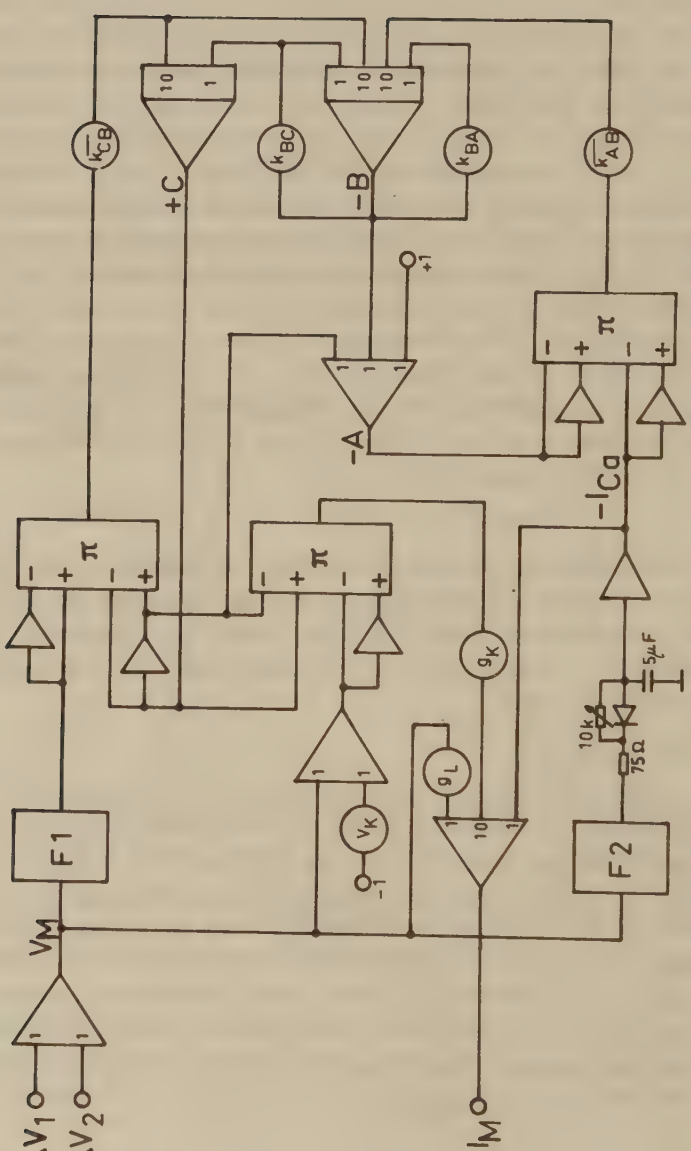


Abb. 5.3.2 Verschaltung des Analogrechners Telefunken RA 710 zur Berechnung der Modellkurven. $\Delta V_1, \Delta V_2$: Kommando-Eingänge zur Eingabe des Potentials; I_M: Ausgang zur Ausgabe des Netto-Membranstroms.

Der letztlich zu simulierende Membranstrom, wie er im Experiment gemessen wird, setzt sich aus drei Komponenten zusammen:

$$I_M(V_M,t) = g_K \cdot C \cdot (V_M-V_K) + I_{Ca} \cdot (V_M,t) + g_L(V_M) \qquad (5.3.11.)$$

g_K und g_L sind Konstanten, die dem maximal möglichen Kalium-Leitwert sowie der Leck-Leitfähigkeit der Membran entsprechen. Kalium- und Leck-Strom berechnen sich in einfachster Weise aus dem mit dem Leitwert multiplizierten Abstand vom jeweiligen Gleichgewichtspotential, das für den Leckstrom als gleich dem Haltepotential angenommen wird.

Abb. 5.3.2 zeigt die vollständige Programmierung des Analogrechners Telefunken RA 710 zur Lösung der Gleichungen. Die noch freien Parameter wurden empirisch so eingestellt, daß die experimentellen Kurven der Abb. 4.2.5 (Exp. Nr. 41) bestmöglich wiedergegeben wurden.

Das Potential wurde im Maßstab 50:1 mit 50 mV Vorspannung skaliert, d.h. 0 V am Rechner entsprachen dem Haltepotential von -50 mV. Bei der Optimierung der Einstellung der Koeffizientenpotentiometer wurden die Lösungen mit 10-facher Zeitdehnung berechnet, beim Ausschreiben der endgültigen Kurven auf einem XY-Schreiber wurde durch Vergrößerung der Integrationskondensatoren 100-fache Zeitdehnung eingestellt.

Die weiteren zur Simulation eingestellten Koeffizienten waren wie folgt:

$g_K = 0.133$ $\quad g_L = 0.135$ $\quad I_{Ca} = 0.3$ $\quad E_K = -70$ mV

$\tau_{Ca\ on} = 2.8$ ms $\quad \tau_{Ca\ off} = 110$ us

$\overline{k_{AB}} = 0.33$ $\quad k_{BA} = 0.0255$ $\quad k_{BC} = 0.55$ $\quad \overline{k_{CB}} = 1.0$

In Abb. 5.3.3 sind einige mit dieser Einstellung berechneten Lösungskurven gezeigt, die unmittelbar mit experimentellen Stromkurven vergleichbar sind.

Abb. 5.3.3.A zeigt einfache Depolarisationen auf -30 bis +130 mV. Anhand der bei den jeweiligen Stromspuren angegebenen Membranpotentiale ist leicht die N-förmige I-V-Kennlinie bei isochroner Strommessung am Ende der Pulse zu verifizieren. Sowohl die Lage des Maximums der Kennlinie bei +70 mV als auch der Zeitverlauf der Ströme über den gesamten Potentialbereich sind in ausgezeichneter Übereinstimmung mit den experimentellen Kurven.

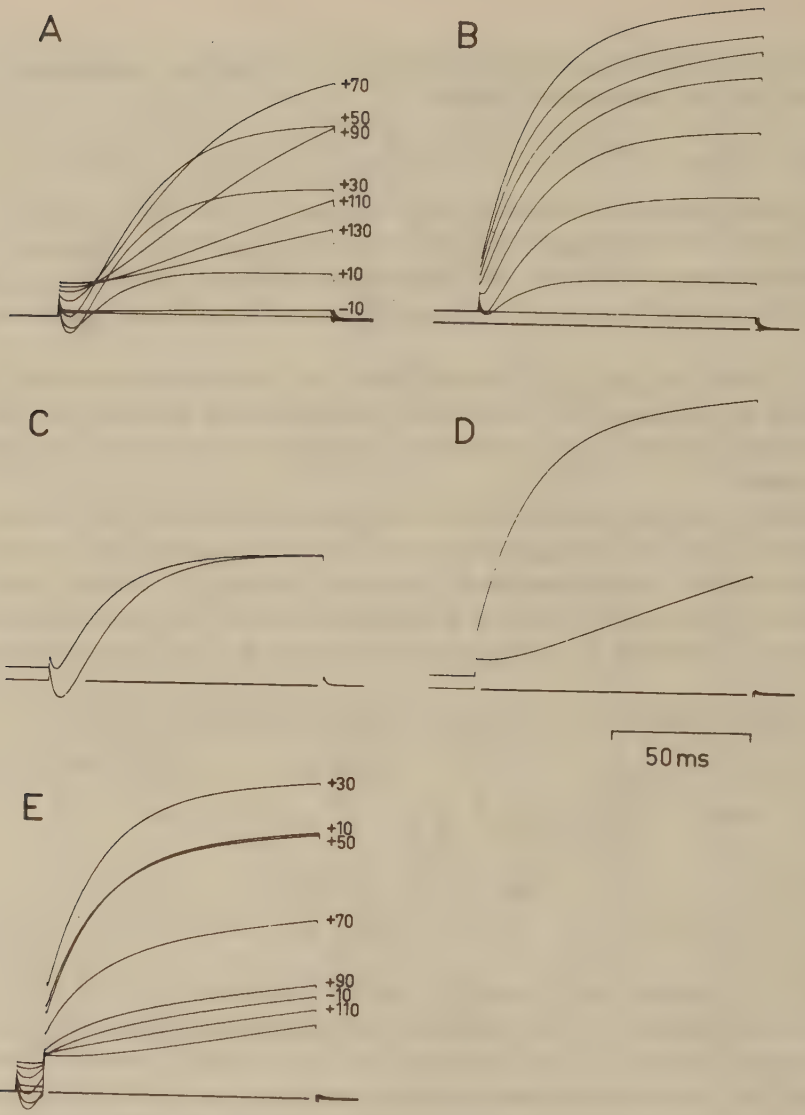


Abb. 5.3.3 A: Berechnete Modellkurven einer Zelle des C-Typs bei Depolarisationen auf die angegebenen Potentiale. B: Gleiche Depolarisationen nach einem Vorpuls auf -1o mV/1oo ms. C, D: Direkter Vergleich der berechneten Ströme mit und ohne Vorpuls bei einer Depolarisation auf +3o mV (C) bzw. +11o mV (D). E: Berechnete Modellkurven bei einer konstanten Depolarisation auf +15o mV nach kurzen Vorpulsen auf die angegebenen Potentiale.

Der auffälligste Unterschied zu den Ergebnissen von Exp. Nr. 41 besteht in dem zu hohen Leckstrom bei den kleinen Depolarisationen von -30 und -10 mV im Modell, wo die experimentellen Resultate noch keinen Stromfluß zeigen. Der Grund dafür liegt in der speziell bei höheren Depolarisationen ausgeprägten Nichtlinearität des Leckstroms, während im Modell ein lineares Verhalten angenommen wurde. Um dennoch den bei hohen Depolarisationen auffällig großen Leckstrom korrekt wiederzugeben, mußte ein Wert eingestellt werden, der bei den kleinen Depolarisationen notwendigerweise zu große Werte liefert.
Eine der postulierten Nichtlinearität analoge Gleichrichtung des Leckstroms wurde bereits für das Tintenfisch-Axon beschrieben (Adelman und Taylor 1961) und ist auch nicht weiter erstaunlich angesichts der hohen Feldstärken über der Membran, die schließlich bei Potentialen ab etwa 180 mV zum dielektrischen Durchbruch führen (Johnson und Roots 1972).
In Abb. 5.3.3.B sind die gleichen Depolarisationen nach einem Vorpuls auf -10 mV und 100 ms Dauer gezeigt, wobei die Spuren für Depolarisationen von +30 und +110 mV in C und D nochmals separat zum unmittelbaren Vergleich mit dem Stromverlauf ohne Vorpuls gezeigt sind. Die durch die Vorpulse bewirkten Veränderungen entsprechen genau den experimentell beobachteten, insbesondere auch das Einmünden beider Spuren bei +30 mV gegen Ende des Pulses. Dagegen erreicht der Auswärtsstrom während dem Vorpuls wesentlich höhere Werte als im Experiment, in dem er von der Nullinie praktisch nicht zu unterscheiden ist. Dies liegt sowohl an der schon besprochenen Nicht-Linearität der Leck-Konduktivität als auch am potentialabhängigen Anschalten des Stromes, das an der Membran anscheinend noch etwas steiler als im Modell ist.
Abb. 5.3.3.E schließlich zeigt die Clampströme bei einer konstanten Testdepolarisation auf +150 mV nach verschieden hohen Vorpulsen von 10 ms Länge. Experimentelle Ergebnisse bei gleichen Clamppulsen zeigt Abb. 4.2.10 (Exp. Nr. 74). Beim Vergleich ist zu berücksichtigen, daß die Einstellung für diese Rechnung nicht verändert wurde, d.h. also nicht für diese andere Zelle neu optimiert wurde.
In Anbetracht der relativ geringen Zahl der freien Parameter des Modells kann die Übereinstimmung mit den experimentellen Daten als durchaus befriedigend angesehen werden. Der für den Ca-Influx angenommene Verlauf (Abb. 5.3.1) entspricht qualitativ den mit Aequorin gemessenen Werten (Heyer und Lux 1977, Eckert et al. 1977), doch liegt das Maximum bei dieser Methode klar bei höheren Potentialen als im Modell. Als Erklärung bieten sich vor allem im Modell nicht berücksichtigte Einflüsse des Membranpotentials auf die Bindungsreaktion oder die mittlere Verweildauer der gebundenen Ca-Ionen an.

Beides kann dazu führen, daß die Zahl der Kanäle im Zustand B am Ende des Vorpulses bereits bei Potentialen wieder abnimmt, bei denen das Maximum des Ca-Einstroms noch nicht erreicht ist.

Eine vergleichende Kritik des besprochenen Modells mit alternativen Modellen Ca-abhängiger Aktivierung ist nicht möglich, da seit der erstmaligen Beschreibung durch Meech (1972, 1974) die Entwicklung anderer Modellvorstellungen noch nicht bekannt wurde. Das einzige veröffentlichte Modell eines K-Kanals unter Beteiligung von Kalzium bei der Steuerung der Membranpermeabilität (Kohler 1977) betrifft ausschließlich den klassischen Kalium-Strom des Tintenfisch-Axons, der am ehesten mit der P-Komponente bei Helix zu vergleichen ist. Adsorption von Ca im Kanal hat dort den genau umgekehrten Effekt wie beim C-System, nämlich Blockierung der K-Permeabilität, während die Aktivierung gerade bei Desorption des Ca erfolgt. Auf ähnlicher Basis arbeitet auch das mit expliziter Beteiligung von Ca formulierte Modell des Na-Kanals von Gotoh (1975).
Wie bereits erwähnt, entstand das Modell im Einklang mit dem von Lux erkannten Widerspruch zu der von Meech und Standen (1975) vertretenen Hypothese einer potentialunabhängigen Aktivierung durch einfache Bindung von Kalzium an der Innenseite der Membran. Neuere Untersuchungen der intrazellulären Effekte von Kalzium (Hofmeier und Lux 1978a, b) ergaben überdies weitere unabhängige Beweise der prinzipiellen Verschiedenheit beider Systeme.
Als besonders glücklicher Umstand im Falle des untersuchten C-Systems ist zu werten, daß durch die Möglichkeit der momentanen Unterbindung des Ca-Einstroms, und damit der Reaktion A⇌B, die einzelnen Zustände der Messung unmittelbar zugänglich sind. Unter Einsatz neuer Meßmethoden, wie der spektralphotometrischen Bestimmung des Ca-Influx unter Benutzung der Reaktion von Ca mit dem Farbstoff Arsenazo III (Brown et al. 1975) sind derartige Untersuchungen zur weiteren physikalischen Definition des Systems bereits in Angriff genommen (Lux, pers.Mitt.).
Weitere Untersuchungen galten der Untersuchung der Ca-Permeabilität der Zustände A und B (Lux und Hofmeier 1978, Hofmeier und Lux 1979).
Die Potentialabhängigkeit der Bindung des Kalzium im Kanal sowie die Lage der Bindungsstelle in der Membran konnte durch eine Verfeinerung der Vorpulsmethode aufgeklärt werden (Lux und Hofmeier, in Vorbereitung). Die weiteren Untersuchungen zum Bindungsmechanismus werden unter Benutzung der von Lux und Hever (1979) vermuteten abnehmenden Effektivität der Aktivierung durch Erdalkali-Ionen in der Reihenfolge Mg > Ca > Ba erfolgen, die durch die in Kap.3.5. mit unabhängiger Methodik

gefundene Reihenfolge Ca > Sr > Ba ergänzt und bestätigt wird. Da diese Ionen gleichzeitig in gleicher Reihenfolge zu größeren Einwärtsströmen führen, ist anzunehmen, daß sie schwächer binden und dadurch die Reaktionsrate k_{AB} verkleinert wird.
Zur Untersuchung der zur K-Permeabilität führenden Reaktion B→C wurden Befunde gemeinsam mit Westerfield und Lux mittels der Rauschanalyse erhoben. Diese Ergebnisse liefern die Werte der entsprechenden Ratenkonstanten, und man erhält auf diese Weise den genaueren Verlauf der Reaktionsrate k_{CB} in Abhängigkeit vom Membranpotential.

Nach Erweiterung der in Abb. 5.3.2. gezeigten Rechenschaltung durch eine Membrankapazität am Eingang Δ V sowie Anschluß des Ausgangs I_M an diesen Eingang war es möglich, Aktionspotentiale zu erzeugen, die alle charakteristischen Eigenschaften der spontanen Aktivität der Neurone des C-Typs hatten. Gemeinsam mit Lux wurde das Modell später so weiterentwickelt, daß auch die Depression des Auswärtsstroms und damit die charakteristischen Formveränderungen der Aktionspotentiale im Verlauf eines Burst simuliert werden konnten.

6. Literaturverzeichnis

Adelman, W.A., Taylor, R.E. (1961): Leakage current rectification in the squid giant axon. Nature 190, 883.

Adelman, W.J.jr. (1971): Electrical studies of internally perfused squid axons. In: Biophysics and Physiology of Excitable Membranes, ed. by Adelman, W.J.jr., Van Nostrand Reinhold Co, N.Y.

Alving, B.O. (1969): Differences between pacemaker and non-pacemaker neurons of Aplysia on voltage-clamping. J. Gen. Physiol. 54, 512.

Amoroso, E.C., Baxter, M.I., Chiquoine, A.D., Nisbet, R.H. (1964): The fine structure of neurons and other elements in the nervous system of the giant african land snail Archachatina marginata. Proc. Roy. Soc. Lond. B160, 167.

Armstrong, C.M., Binstock, L. (1965): Anomalous rectification in the squid giant axon injected with TEA-chloride. J. Gen. Physiol. 48, 859.

Armstrong, C.M., Hille, B. (1972): The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier. J. Gen. Physiol. 59, 388.

Armstrong, C.M., Bezanilla, F., Rojas, E. (1973): Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. J. Gen. Physiol. 62, 375.

Baker, P.F., Hodgkin, A.L., Ridgway, E.B. (1971): Depolarization and calcium entry in squid giant axons. J. Physiol. 218, 709.

Barr, L. (1965): Membrane potential profiles and the Goldman equation. J. Theor. Biol. 9, 351.

Barrett, E.F., Barrett, J.N. (1976): Separation of two voltage-sensitive potassium-currents, and demonstration of a TTX-resistant calcium-current in frog motoneurons. J. Physiol. 255, 737.

Bass, L., (1974): Current-voltage relations in nerve membranes. J. Theor. Biol. 43, 133.

Begenisich, T., Lynch, C. (1974): Effects of internal divalent cations on voltage-clamped squid axons. J. Gen. Physiol. 63, 675.

Bělehrádek, J. (1935): Temperature and living matter. Protoplasma-Monographien, Vol. 8, Verlag v. Gebrüder Bornträger, Berlin.

Benz, R., Fröhlich, O., Läuger, P., Montal, M. (1975): Electrical capacity of black lipid films and of lipid bilayers made from monolayers. Biochim. Biophys. Acta 394, 323.

Bezanilla, F., Armstrong, C.M. (1972): Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. J. Gen. Physiol. 60, 588.

Binstock, L., Adelman, W.J., Senft, J.P., Lecar, H. (1975): Determination of the resistance in series with the membrane of giant axons. J. Membr. Biol. 21, 25.

Bocharova, L.S., Kostenko, M.A., Veprintsev, B.N., Allachverdov, B.L. (1975): Completely isolated molluscan neurons. An ultrastructural study. Brain Res. 101, 185.

Bosch Technisches Taschenbuch (1954): Robert Bosch GmbH, Stuttgart Deutscher Ingenieur Verlag GmbH, Düsseldorf.

Brown, J.E., Cohen, L.B., DeWeer, P., Pinto, L.Y., Ross, W.N., Salzberg, B.M. (1975): Rapid changes of intracellular free calcium concentration: Detection by metallochromic indicator dyes in squid giant axon. Biophys. J. 15, 1155.

Chamberlain, S.G., Kerkut, G.A. (1969): Voltage clamp analysis of the Na and Ca inward currents in snail neurons. Comp. Biochem. Physiol. 28, 787.

Christoffersen, G.R.J., Simonsen, L. (1977): Ca^{++}-sensitive microelectrode: intracellular steady state measurement in nerve cell. Acta Physiol. Scand. 101, 492.

Colding-Jørgensen, M. (1976): A description of adaptation in excitable membranes. J. theor. Biol. 63, 61.

Cole, K.S. (1949): Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. Arch. Sci. Physiol. 3, 253.

Connor, J.A. (1977): Time course separation of two inward currents in molluscan neurons. Brain Res. 119, 487.

Connor, J.A., Stevens, C.F. (1971): Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under v.c. J. Physiol. 213, 1.

D'Arrigo, J.S. (1974): Axonal surface charges: binding or screening by divalent cations governed by external pH. J. Physiol. 243, 757.

Daut, J. (1973a): Der Einfluß eines schnellen Kalium-Stromes in der Zellmembran auf erregende synaptische Potentiale in Nervenzellen von Schnecken. Diss. München LMU.

Daut, J. (1973b): Modulation of the excitatory synaptic response by fast transient K^+-current in snail neurons. Nature New Biol. 246, 193.

Davies, C.W., Hoyle, B.E. (1955): The interaction of calcium ions with some citrate buffers: A correction. J. Chem. Soc. 1955, 1035.

Dodge, F., Frankenhaeuser, B. (1958): Membrane currents in isolated frog nerve fibre under voltage clamp conditions. J. Physiol. 143, 76.

Douglas, W.W. (1974): Involvement of calcium in exocytosis and the exocytosis-vesiculation sequence. Biochem. Soc. Symp. 39, 1.

Ducreux, C., Gola, M. (1977): Ionic mechanism of Ba^{++}-induced square-shaped potential waves in molluscan neurons. Brain Res. 123, 384.

Eckert, R., Lux, H.D. (1976): A voltage-sensitive persistant calcium conductance in neuronal somata of Helix. J. Physiol. 254, 129.

Eckert, R., Tillotson, D., Ridgway, E.B. (1977): Voltage-dependent facilitation of Ca^{++}-entry in voltage-clamped, aequorin-injected molluscan neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 1748.

Eisenberg, R.S., Engel, E. (1970): The spatial variation of membrane potential near a small source of current in a sperical cell. J. Gen. Physiol. 55, 736.

Fernandez, J. (1966): Nervous system of the snail Helix Aspersa; I: Structure and histochemistry of ganglionic sheath and neuroglia. J. Comp. Neurol. 127, 157.

Fishman, H.M. (1975): Patch-voltage clamp of squid axon membrane. J. Membr. Biol. 24, 265.

Frank, K., Tauc, L. (1964): Voltage clamp studies of molluscan neuron membrane properties, In: The cellular function of membrane transport, ed. by Hoffman, J.F., Prentice Hall Inc., Engewood Cliffs N.J.

Frankenhaeuser, B. (1963): A quantitative description of potassium currents in myelinated nerve fibres of Xenopus laevis. J. Physiol. 169, 424.

Frankenhaeuser, B., Hodgkin, A.L. (1957): The action of calcium on the electrical properties of squid axons. J. Physiol. 137, 218.

Frehland, E., Läuger, P. (1974): Ion transport through pores. Transient phenomena. J. theor. Biol. 47, 189.

Gainer, H. (1972): Patterns of protein synthesis in individual, identified molluscan neurons. Brain Res. 39, 369.

Gesteland, R.C., Howland, B., Lettvin, J.Y., Pitts, W.H. (1959): Comments on microelectrodes. Proc. IRE 47, 1856.

Gilbert, D.L., Ehrenstein, G. (1969): Effects of divalent cations on potassium conductance of squid axons: determination of surface charge. Biophys. J. 9, 447.

Giloi, W., Herschel, R. (1968): Rechenanleitung für Analogrechner. Telefunken-Fachbuch, Telefunken GmbH, Konstanz.

Glaizner, B. (1968): Pharmacological mapping of cells in the suboesophageal ganglia of Helix Aspersa. In: Neurobiology of Invertebrates, ed. by Salanki, J., Plenum Press, New York, 267.

Gola, M. (1974): Evolution de la forme des potentiels d'action par stimulations repetitives. Pflüg. Arch. 346, 121.

Gola, M., Romey, G. (1971): Responses anomales à des courants sous-liminaires de certaines membranes somatiques. Pflüg. Arch. 327, 105.

Goldman, D.E. (1943): Potential, impedance and rectification in membranes. J. Gen. Physiol. 27, 37.

Goldup, A., Ohki, S., Danielli, J.F. (1970): Black lipid films. In: Recent progress in surface science, ed. by Danielli, J.F., Riddiford, A.C., Rosenberg, M.D., New York, 193.

Gotoh, H. (1975): A model of the activation process of Na-conductance in the squid axon: An approach with interactive desorption kinetics of divalent cations. J. Theor. Biol. 53, 3o9.

Guld, Ch. (1962): Cathode follower and negative capacitance as high input impedance circuits. Proc. IRE 50, 1912.

Hägglund, J.V. (1972): Single ion electrodiffusion models of the late sodium and potassium currents in the giant axon of the squid. J. Membr. Biol. 10, 153.

Hagiwara, A., Fukuda, J., Eaton, D.C. (1974): Membrane currents carried by Ca, Sr and Ba in barnacle muscle fibre during voltage clamp. J. Gen. Physiol. 63, 564.

Hall, J.E., Mead, C.A., Szabo, G. (1973): A barrier model for current flow in lipid bilayer membranes. J. Membr. Biol. 11, 75.

Hartmann, D., Reiter, M. (1965): Elektromechanische Kopplung durch Strontium. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 251, 151.

Heinz, E. (1951): Untersuchungen über Komplexverbindungen des Kalziums. Biochem. Z. 321, 314.

Hellerstein, D. (1968): Passive membrane potentials. Biophys. J. 8, 358.

Heyer, C.B., Lux, H.D. (1976a): Properties of a facilitating calcium current in pacemaker-neurons of the snail, Helix pomatia. J. Physiol. 262, 319.

Heyer, C.B., Lux, H.D. (1976b): Control of the delayed outward potassium currents in bursting pacemaker-neurons of the snail Helix pomatia. J. Physiol. 262, 349.

Heyer, C.B., Lux, H.D., Hofmeier, G. (1976): Effects of calcium and EGTA-injections on delayed voltage-sensitive currents in bursting pacemaker cells of the snail, Helix pomatia. Pflüg. Arch. 365, R33.

Hille, B. (1970): Ionic channels in nerve membranes. Progr. Biophys. Mol. Biol. 21, 1.

Hille, B. (1975): Ionic selectivity, saturation and block in sodium channels; a four barrier model. J. Gen. Physiol. 66, 535.

Hille, B., Woodhull, A.M., Shapiro, B.I. (1975): Negative surface charge near sodium channels of nerve: divalent ions, monovalent ions and pH. Phil. Trans. Roy. Soc. B270, 301.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952): A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol. 117, 500.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., Katz, B. (1952): Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol. 116, 424.

Hodgkin, A.L., Keynes, R.D. (1956): Experiments on the injection of substances into squid giant axons by means of a micro-syringe. J. Physiol. 131, 592.

Hodgkin, A.L., Katz, B. (1949): The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid squid. J. Physiol. 108, 37.

Hofmeier, G., Lux, H.D. (1979): Inversely related behaviour of potassium and calcium permeability during activation of calcium-dependent outward currents in voltage-clamped snail neurones. J. Physiol. 287, 28P.

Howard, R.E., Burton, R.M. (1968): Thin lipid membranes with aqueous interfaces: apparatus design and methods of study. J. Am. Oil Chem. Soc. 45, 202.

Hoyt, R.C. (1963): Sodium inactivation in nerve fibers. Biophys. J. 3, 1o74.

Hoyt, R.C., Adelman, W.J. (197o):Sodium inactivation. Experimental test of two models. Biophys. J. 1o, 61o.

Johnson, F.H., Eyring, H., Pollisar, M.J. (1954): Kinetic basis of molecular biology,,New York, Wiley.

Johnson, P.V., Roots, B.I. (1972): Nerve membranes. Pergamon Press Ltd., Oxford.

Karlson, P. (1972): Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Stuttgart 1972.

Karpenko, L.D. (1966): Correlation of structure and function in neurons of the subpharyngeal ganglion in the vine snail. Fed. Proc. 28, T743.

Katz, B., Miledi, R. (1967): Ionic requirements of synaptic transmitter release. Nature 215. 651.

Kerkut, G.A., Walker, R.J. (1961): The effects of drugs on the neurons of the snail, Helix Aspersa. Comp. Biochem. Physiol. 3, 143.

Kerkut, G.A., Thomas, R.C. (1964): The effect of anion injection and changes in the external K and Cl concentration on the reversal potentials of the IPSP and ACh. Comp. Biochem. Physiol. 11, 199.

Kerkut, G.A., Lambert, J.D., Gayton, R.J., Loker, J.E., Walker, R.J. (1975): Mapping of nerve cells in the suboesophageal ganglia of Helix Aspersa. Comp. Biochem. Physiol. 50A, 1.

Kohler, H.-H. (1977): A single file model for potassium transport in squid giant axon. Biophys. J. 19, 125.

Koopmann, R. (1968): Eine potentiostatische Anordnung mit extrem schneller Regelung. Ber. Bunsen Ges. 72, 43.

Koppenhöfer, E., Vogel, W. (1969): Wirkung von TTX und TEA an der Innenseite der Schnürringsmembran von Xen. laev. Pflüg. Arch. 313, 361.

Kostenko, M.A., Geletyuk, V.I., Veprintsev, B.N. (1974): Completely isolated neurons in the mollusc, Lynaea Stagnalis. Comp. Biochem. Physiol. 49A, 89.

Kostyuk, P.G., Krishtal, O.A., Doroshenko, P.A. (1974): Calcium currents in snail neurons. II. Effects of calcium concentration on the calcium inward current. Pflüg. Arch. 348, 95.

Kostyuk, P.G., Krishtal, O.A., Doroshenko, P.A. (1975a): Outward currents in isolated snail neurones. I:Inactivation kinetics. Comp. Biochem. Physiol. 51C, 259.

Kostyuk, P.G., Krishtal, O.A., Doroshenko, P.A. (1975b): Outward currents in isolated snail neurones. III:Effect of Verapamil. Comp. Biochem. Physiol. 51C, 269.

Kostyuk, P.G., Krishtal, O.A. (1977): Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurons. J. Physiol. 270, 545.

Kostyuk, P.G., Krishtal, O.A. (1977): Effects of calcium and calcium-chelating agents on the inward and outward current in the membrane of mollusc neurons. J. Physiol. 270, 569.

Kreutzberg, G.W., Lux, H.D. (1978): Morphologische Studien, unveröffentlicht.

Krischer, C.C. (1969): Theoretical treatment of ohmic and rectifying properties of electrolyte filled micropipettes. Z. f. Naturforsch. 246, 151.

Krnjevic, K., Lisiewicz, A. (1972): Injections of calcium-ions into spinal motoneurons. J. Physiol. 225, 363.

Kunze, H. (1919): Zur Topographie und Histologie des zentralen Nervensystems von Helix pomatia. Zeitschr. wiss. Zool. 118, 25.

Llinas, R., Blinks, J.R., Nicholson, C. (1972): Ca-transient in presynaptic terminal of squid giant synapse: detection with aequorin. Science 176, 1127.

Lux, H.D., Eckert, R.O. (1974): Inferred slow inward current in snail neurons. Nature 250, 574.

Lux, H.D., Heyer, C.B. (1977): An aequorin study of a facilitating calcium current in bursting pacemaker neurons of Helix. Neuroscience 2, 585.

Magura, I.S., Krishtal, O.A., Valeyev, A.G. (1971): Behaviour of delayed current under long-duration voltage-clamp in snail neurones. Comp. Biochem. Physiol. 40A, 715.

Marmont, G. (1949): Studies on the axon membrane; I: A new method. J. Cell. Comp. Physiol. 34, 351.

Marquart, D.W., Meeter, D.A. (1962): Gaushaus non-linear least-squares curve fitting program. IBM Share Library Programm No. 360D-13.6.007.

Meech, R.W. (1972): Intracellular calcium injection causes increased potassium conductance in Aplysia nerve cells. Comp. Biochem. Physiol. 42A, 493.

Meech, R.W. (1974): The sensitivity of Helix Aspersa neurons to injected calcium ions. J. Physiol. 237, 259.

Meech, R.W., Standen, N.B. (1975): Potassium activation in Helix Aspersa neurons under voltage-clamp: A component mediated by calcium-influx. J. Physiol. 249: 211.

Meincke, K.F. (1974): Die Wirkung der Temperatur auf den Stoffhaushalt von Helix pomatia im Herbst. J. Comp. Physiol. 88, 103.

Meincke, K.F. (1975a): The chemical ingredients of hemolymph and some selected organs of Helix pomatia in constant ambient conditions in the course of the year. Comp. Biochem. Physiol. 52A, 135.

Meincke, K.F. (1975b): The influence of extreme temperatures on metabolic substances in hemolymph and foot muscle of Helix pomatia. Comp. Biochem. Physiol. 51A, 373.

Meissner, H.P. (1965): Das Verhalten der Schürringmembran unter dem Einfluß starker depolarisierender Ströme. Pflüg. Arch. 283, 213.

Meves, H. (1968): The ionic requirements of the production of action potentials in Helix pomatia neurons. Pflüg. Arch. 304, 215.

Mirolli, M., Gorman, A.L.F. (1973): The extracellular space of a simple molluscan nervous system and its permeability to potassium. J. exp. Biol. 58, 423.

Moore, J.W., Gebhardt, J.H. (1962): Stabilized wide band potentiometric amplifiers. Proc. IRE 50, 1928.

Moore, L.E. (1967): Membrane currents at large positive internal potentials in single myelinated nerve fibres of Rana pipiens. J. Physiol. 193, 433.

Mozhayeva, G.N., Naumov, A.P. (1970): Effect of surface charge on the steady-state potassium conductance of nodal membrane. Nature, 228, 164.

Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T., Wescott, W.C. (1962): Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. Nature 194, 979.

Muller, R.V., Finkelstein, A. (1972): The effect of surface charge on the voltage-dependent conductance induced in thin lipid membranes by monazomyzin. J. Gen. Physiol. 60, 285.

Nakajima, S. (1966): Analysis of K inactivation and TEA action in the supramedullary cells of puffer. J. Gen. Physiol. 49, 629.

Narahashi, T. (1961): Effect of barium ions on membrane potentials of cockroach giant axons. J. Physiol. 156, 389.

Neher, E. (1970): Dynamische Eigenschaften von Nervensomamembranen. Diss., Techn. Universität München.

Neher, E. (1971): Two fast transient current components during voltage clamp on snail neurons. J. Gen. Physiol. 58, 36.

Neher, E., Lux, H.D. (1969): Voltage clamp on Helix pomatia neuronal membrane: Current measurement over a limited area of soma surface. Pflüg. Arch. 311, 272.

Neher, E., Lux, H.D. (1971): Properties of somatic membrane patches of snail neurons under voltage clamp. Pflüg. Arch. 322, 35.

Neher, E., Lux, H.D. (1972): Differential action of TEA^+ on two K^+-current components of a molluscan neurone. Pflüg. Arch. 336, 87.

Neild, T.O. (1974): A method of ligaturing the axons of molluscan neurons. J. Physiol. 248, 18P.

Owen, J.D., Brown, H.M., Pemberton, J.P. (1977): Neurophysiological applications of a Ca-selective microelectrode. Analyt. Chim. Acta 90, 241.

Parsegian, V.A. (1975): Ion-membrane interactions as structural forces. In: Carriers and channels in Biological systems, ed. by Shamoo, A.E., Ann. N.Y. Acad. Sci. 264, 161.

Peskoff, A., Eisenberg, R.S. (1975): The time-dependent potential in a spherical cell using matched asymptotic expansions. J. Math. Biol. 2, 277.

Peskoff, A., Ramirez, D.M. (1975): Potential induced in a spherical cell by an intracellular point source and an extracellular point sink. J. Math. Biol. 2, 301.

Petersen, O. (1963): Technische Pufferlösungen als Eichlösungen für pH-Messungen im Temperaturbereich zwischen 0 und 100°C. Chemie-Ing.-Technik 40, 76.

Portzehl, H., Caldwell, P.C., Ruegg, J.C. (1964): The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab Maia squinada on the internal concentration of free Ca-ions. Biochim. Biophys. Acta 79, 581.

Reuter, H. (1973): Divalent ions as charge carriers in excitable membranes. Progr. Biophys. Mol. Biol. 26, 1.

Rojas, E., Atwater, I. (1967): Blocking of K currents by pronase in perfused giant axons. Nature 215, 850.

Rojas, E., Armstrong, C.M. (1971): Na-conductance activation without inactivation in pronase-perfused axons. Nature New Biol. 229, 177.

Rose, B., Loewenstein, W.R. (1975): Calcium ion distribution in cytoplasm visualized by aequorin: diffusion in cytosol restricted by energized sequestering. Science 190, 1204.

Rose, B., Loewenstein, W.R. (1976): Permeability of a cell junction and the local cytoplasmic free ionized calcium concentration: A study with aequorin. J. Membr. Biol. 28, 87.

Sakharov, D.A., Salanki, J. (1969): Physiological and pharmacological identification of neurons in the central nervous system of Helix pomatia. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 35, 19.

Salanki, J., Vadasz, I., Elekes, K. (1972): Physiological and morphological characteristics of Br-type neuron in the central nervous system of the snail, Helix pomatia L. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 42, 243.

Salanki, J., Vadasz, I. (1973): Chemical sensitivity at different temperatures of the Br-type bimodal pacemaker neurone in the CNS of the snail Helix pomatia L. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 44, 51.

Sillén, L.G., Martell, A.E. (1964): Stability constants of metal-ion complexes. Special Publication No. 17, Section II, The Chemical Society, London.

Singer, S.J., Nicolson, G.L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720.

Smythies, J.R., Benington, F., Bradley, R.J., Bridgers, W.F., Morin, R.D. (1974): The molecular structure of the Na-channel. J. theor. Biol. 43, 29.

Sperelakis, N., Schneider, M.F., Harris, E.J. (1967): Decreased K^+-conductance produced by Barium in frog sartorius fibres. J. Gen. Physiol. 50, 1565.

Stepita-Klauco, M., Dolezalova, H., Giacobini, E. (1973): The action of piperidine on cholinoceptive neurons of the snail. Brain Res. 63, 141.

Stinnakre, J., Tauc, L. (1973): Calcium-influx in active Aplysia neurons detected by injected aequorin. Nature New Biol. 242, 113.

Tasaki, I., Singer, I. (1968): Some problems involved in electric measurements of biological systems. Ann. N.Y. Acad. Sci. 148, 36.

Teorell, T. (1948): Membrane electrophoresis in relation to bio-electrical polarization effects. Arch. Sci. Physiol. 3, 205.

Urry, D.W., Long, M.M., Jacobs, M., Harris, R.D. (1975): Conformation and molecular mechanisms of carriers and channels. Ann. N.Y. Acad. Sci. 264, 203.

Walker, R.J., Lambert, D.C., Woodruff, G.N., Kerkut, G.A. (1970): Action potential shape and frequency as criteria for neuron identification in the snail, Helix Aspersa. Comp. Gen. Pharmacol. 1, 409.

Wei, L.Y. (1963): Molecular mechanisms of nerve excitation and conduction. Bull. Math. Biophys. 31, 39.

White, S.H. (1977): Studies of the physical chemistry of planar bilayer membranes using high precision measurements of specific capacitance. Ann. N.Y. Acad. Sci. 303, 243.

Williams, R.J.P. (1976): Calcium chemistry and its relation to biological function. In: Calcium in biological Systems, ed. by Duncan, C.J., Cambridge Univ. Press, New York.

Hofmeier, G., Lux, H.D. (1979a): Time courses of intracellular free calcium and related electrical effects after injection of $CaCl_2$. Pflügers Arch. 373, R47.

Hofmeier, G., Lux, H.D. (1979b): Investigations on two calcium-dependent potassium currents in Helix neurones by means of calcium-sensitive microelectrodes. Neurosc. Letters, Suppl.1, S77.

Lux, H.D., Hofmeier, G. (1978): Kinetics of the calcium-dependent potassium current in Helix neurons. Pflügers Arch. 373, R47.

Lux, H.D., Heyer, C.B. (1979): A new electrogenic calcium-potassium system. In: The Neurosciences. Fourth Study Program. Eds.in chief: F.O.Schmitt and F.G.Worden, The MIT Press, Cambridge, MA, pp. 601-615.

Nach Entwurf und Aufbau der geschilderten Methodik wurden die Experimente für die vorliegende Arbeit zwischen November 1974 und Juni 1976 in der Abteilung Neurophysiologie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof.Dr. H.D. Lux für die Anregung des Themas und die mir jederzeit großzügig gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeiten.

Herrn Prof.Dr. R. Röhler danke ich für seine fachlichen Anregungen und die Betreuung der Dissertation in der Fakultät für Physik.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen im Institut und insbesondere der Abteilung Neurophysiologie bedanken, die durch technische Hilfe und klärende Diskussionen zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

6.1o.42	In Berlin als zweiter Sohn von Dr.phil. Walter Hofmeier und seiner Ehefrau Erika, geb. Kopp, geboren.
1949-1953	Besuch der Grundschule in Kelkheim/Ts.
1954-196o	Besuch der Friedrich-Ebert-Schule/Neusprachliches Gymnasium in Bonn/Rh.
196o-1962	Besuch des Realgymnasiums in Starnberg mit Abitur
Okt.62-März64	Ableistung des Grundwehrdienstes
SS 1964	Aufnahme des Physik-Studiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
SS 69- SS 71	Arbeit an der Diplomarbeit am Institut für Astrophysik unter Anleitung von Prof.Dr.P.Wellmann
WS 71/72	Abschluß des Studiums mit Diplom
Okt.72	Beginn der Tätigkeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Abt. Neurophysiologie als Stipendiat der Max-Planck-Gesellschaft mit experimenteller Arbeit an der vorliegenden Dissertation
Aug.73	Verheiratung mit der Krankengymnastin Gabriele Quellhorst
Apr.78	Mitarbeit im Rahmen des Schwerpunktprogramms Epilepsieforschung der Deutschen Forschungsgemeinschaft mit elektrophysiologischen Untersuchungen an Hirnschnittpräparaten
Aug.78	Geburt unserer Tochter Julia